

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 特許公報 (B2)

(11) 特許番号

第2656774号

(45) 発行日 平成9年(1997)9月24日

(24) 登録日 平成9年(1997)5月30日

(51) Int.Cl.  
G 0 1 N 33/53  
33/577

識別記号 執内整理番号

P I  
G 0 1 N 33/53  
33/577

技術表示箇所  
W  
B

発明の数2(全28頁)

(21) 出願番号 特願昭62-245737  
(22) 出願日 昭和62年(1987)9月29日  
(65) 公開番号 特開昭63-277968  
(43) 公開日 昭和63年(1988)11月15日  
(31) 優先権主張番号 913140  
(32) 優先日 1986年9月29日  
(33) 優先権主張国 米国(US)

前記審査

(73) 特許持者 99999999  
スクリップス クリニック アンド リ  
サーチ ファウンデーション  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
92037 ラ ジョラ ノース トーリー  
バインス ロード 10666  
(72) 発明者 リチャード エス スミス  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
92104 デル マー ヴィア ドナダ  
12790  
(72) 発明者 ドリーン エム ホーグル  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
92117 サン デイエゴ パーク リム  
ドライヴ 5057  
(74) 代理人 弁理士 中村 敏 (外3名)

審査官 龟田 宏之

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 異常脂質代謝の標識に対する検定法および診断装置

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 血液試料の単位容積当たりのヒトのアボリボタンパク質B-100およびアボリボタンパク質A-1の量を検定して試料中のアボリボタンパク質B-100とアボリボタンパク質A-1との比を決定する段階を含む異常脂質代謝の標識を検定する方法であって、

(a) ヒトのアボタンパク質B-100含有液体血液試料の第1アリコートを、

(i) 前記第1液体試料アリコートを、アボリボタンパク質B-100と免疫反応し、かつATCC受託番号HB8742またはHB8746を有するハイブリドーマの1つにより分泌される固相に結合した第1单クローニングパラトープ分子を有する固体マトリックスから実質的になり、支持体の表面が非特異性結合部位をプロックされた固体支持体と混合して第1固-液相複合物を形成し、

2

(ii) 前記第1固-液相複合物を生物学的検定条件下に、前記第1パラトープ分子が試料アリコート中に存在するアボリボタンパク質B-100と免疫反応して前記試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質B-100を含む固相結合免疫反応を形成するに十分な予定期間保持し、

(iii) 前記第1液体試料アリコート中のアボリボタンパク質B-100を、アボリボタンパク質B-100と免疫反応し、かつATCC受託番号HB8742またはHB8746を有するハイブリドーマの1つにより分泌される固相に結合した第1单クローニングパラトープ分子を有する固体マトリックスから実質的になり、支持体の表面が非特異性結合部位をプロックされた固体支持体と混合して第2固-液相複合物を形成し、

(iv) 前記第2固-液相複合物を生物学的検定条件下に、前記第2指示手段結合パラトープ分子が試料アリコート中の実質的結合部位を認識する。

特許2656774

(2)

3

- 質的にすべてのアボリボタンパク質B-100を含む免疫反応物を形成するのに十分な時間保持し、  
 (v) 上記段階(a) (i~iv) から生ずる固相と液相を分離し、  
 (vi) 分離した固相中に存在する指示手段結合アボリボタンパク質B-100含有免疫反応物の量、およびそれにより試料の単位容積中のアボリボタンパク質B-100の量を測定する。  
 ことにより存在するアボリボタンパク質B-100の量について検定し。  
 (b) アボリボタンパク質A-Iを含み、アンマスキング処理のない前記液体血液試料の第2アリコートを、  
 (i) 前記第2液体試料アリコートを、アボリボタンパク質A-Iと免疫反応し、かつATCC受託番号HB9200またはHB9201を有するハイブリドーマの1つにより分泌される固相に結合した第3単クローニングバラトープ分子を有する固体マトリックスから実質的になり、固体支持体の表面が非特異的結合をプロックされた固体支持体と混合して第3固-液相混合物を形成し、  
 (ii) 前記第3固-液相混合物を生物学的検定条件下に、前記第3バラトープ分子が試料アリコート中に存在するアボリボタンパク質A-Iと免疫反応して試料アリコート中の実質的にすべてのアボリボタンパク質A-Iを含む固相結合免疫反応物を形成するのに十分な予定期間保持し、  
 (iii) 前記第2液体試料アリコート中のアボリボタンパク質A-Iを、アボリボタンパク質Aと免疫反応し、かつATCC受託番号HB9200またはHB9201を有するハイブリドーマの1つにより分泌されるが、しかし段階(b)  
 (i)において使用されず、酵素指示手段に作用可能に結合された液相第4単クローニングバラトープ分子と混合して第4混合物を形成し、  
 (iv) 前記第4混合物を生物学的検定条件下に、前記第4指示手段結合バラトープ分子が試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質A-Iと免疫反応物を形成するのに十分な予定期間保持し、  
 (v) 上記段階(b) (i~iv) から生ずる固相と液相を分離し、  
 (vi) 分離した固相中に存在する指示手段結合アボリボタンパク質A-I含有免疫反応物の量、およびそれにより試料の単位容積中のアボリボタンパク質A-Iの量を測定する。  
 ことにより存在するアボリボタンパク質A-Iの量について検定する。  
 ことを含む方法。  
 【請求項2】段階(a) (i) および (a) (iii) の混合が実質的に同時にに行なわれ、前記保持段階(a) (ii) および (a) (iv) が一緒にに行なわれる、特許請求の範囲第(1)項記載の方法。

- 【請求項3】段階(a) (ii) 後に存在する固相および液相が段階(a) (iii) の前に分離され、段階(a) (iii)において混合される第1液体アリコート中のアボリボタンパク質B-100が段階(a) (ii)において形成された固相結合免疫反応物中に存在する、特許請求の範囲第(1)項記載の方法。  
 【請求項4】段階(b) (ii) 後に存在する固相および液相が段階(b) (iii) の前に分離され、段階(b) (iii)において混合される第2液体アリコート中のアボリボタンパク質A-Iが段階(b) (ii)において形成された固相結合免疫反応物中に存在する、特許請求の範囲第(1)項記載の方法。  
 【請求項5】段階(b) (i) および (b) (ii) の混合が実質的に同時にに行なわれ、前記保持段階(b) (ii) および (b) (iv) が一緒にに行なわれる、特許請求の範囲第(1)項記載の方法。  
 【請求項6】血液試料の単位容積当たりのヒトアボリボタンパク質B-100およびアボリボタンパク質A-Iの量を検定し、試料中のアボリボタンパク質B-100のアボリボタンパク質A-Iとの比を決定する段階を含む真膚脂質代謝の標識を検定する方法であって、  
 (a) ヒトのアボリボタンパク質B-100含有液体血液試料の第1アリコートを、  
 (i) 前記第1液体試料アリコートを、アボリボタンパク質B-100と免疫反応し、かつATCC受託番号HB8742またはHB8746を有するハイブリドーマの1つにより分泌される固相に結合した第1単クローニングバラトープ分子を有する固体マトリックスから実質的になり、支持体の表面が非特異的結合部位をプロックされた固体支持体およびATCC受託番号HB8742またはHB8746を有するハイブリドーマのいずれかにより分離され、固体マトリックスに結合した第1バラトープ分子でない酵素指示手段に作用可能に結合した第2単クローニングバラトープ分子と実質的に同時に混合することにより第1固-液相混合物を形成し、  
 (ii) 前記第1固-液相混合物を生物学的検定条件下に、前記第1バラトープ分子および前記指示手段結合第2バラトープ分子が試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質B-100と免疫反応して固相結合サンドイッチ免疫反応物および液相を形成するのに十分な予定期間保持し、  
 (iii) 固相と液相を分離し、  
 (iv) 分離した固相中に存在する指示手段結合アボリボタンパク質B-100含有サンドイッチ免疫反応物の量、およびそれにより試料の単位容積中のアボリボタンパク質B-100の量を測定する。  
 ことにより存在するアボリボタンパク質B-100の量について検定し。  
 (b) アボリボタンパク質A-Iを含み、アンマスキング処理のない前記液体血液試料の第2アリコートを、  
 (i) 前記第2液体試料アリコートを、アボリボタンパ

特許 2656774

(3)

5

ク質A-Ⅰと免疫反応し、かつATCC受託番号HB9200またはHB9201を有するハイブリドーマの1つにより分泌される固相に結合した第3単クローン性パラトープ分子から実質的になり、支持体の表面が非特異的結合部位をブロックされた固体支持体およびATCC受託番号HB9200またはHB9201を有するハイブリドーマのいずれかにより分泌され、固体マトリックスに結合した第3パラトープ分子でない酵素指示手段に作用可能に結合した第4単クローン性パラトープ分子と実質的に同時に混合することにより第2固-液相混合物を形成し、

(ii) 前記第2固-液相混合物を生物学的検定条件下に、前記第3パラトープ分子および前記指示手段結合第4パラトープ分子が試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質A-Ⅰと免疫反応して固相結合サンドイッチ免疫反応物および液相を形成するのに十分な予定時間保持し、

(iii) 固相と液相を分離し、

(iv) 分離した固相中に存在する指示手段結合アボリボタンパク質A-Ⅰ含有サンドイッチ免疫反応物の量、およびそれにより試料の単位容積中のアボリボタンパク質A-Ⅰの量を測定する、ことにより存在するアボリボタンパク質A-Ⅰの量について検定する。

ことを含む特許請求の範囲第(2)又は(5)項に記載の方法。

【請求項7】第1パラトープ分子がATCC受託番号HB8746を有するハイブリドーマにより分泌される、特許請求の範囲第(6)項記載の方法。

【請求項8】第3パラトープ分子がATCC受託番号HB9200を有するハイブリドーマにより分泌される、特許請求の範囲第(6)項記載の方法。

【請求項9】段階(a)(ii)および(b)(ii)の生物学的検定条件下の保持が周囲室温で30~60分の時間である、特許請求の範囲第(6)項記載の方法。

【請求項10】保持が30分の時間であり、かくはん下に行なわれる、特許請求の範囲第(9)項記載の方法。

【請求項11】液体血液試料中のアボリボタンパク質B-100とアボリボタンパク質A-Ⅰとの比の測定に使用される診断装置であって、

(a) アボリボタンパク質B-100と免疫反応し、かつATCC受託番号HB8742またはHB8746を有するハイブリドーマにより分泌されるパラトープ分子を有する第1容器、

(b) アボリボタンパク質B-100と免疫反応し、かつATCC受託番号HB8742またはHB8746を有するハイブリドーマにより分泌されるが、しかし第1容器中になく、酵素指示手段に作用可能に結合されたパラトープ分子を有する第2容器、

(c) アボリボタンパク質A-Ⅰと免疫反応し、かつATCC受託番号HB9200またはHB9201を有するハイブリドーマにより分泌されるパラトープ分子を有する第3容器、

6

(d) アボリボタンパク質A-Ⅰと免疫反応し、かつATCC受託番号HB9200またはHB9201を有するハイブリドーマにより分泌されるが、しかし第3容器中になく、酵素指示手段に作用可能に結合されるパラトープ分子を有する第4容器、

を含み、前記各パラトープ分子が前記比の1測定の実施に十分な量存在する診断装置。

【請求項12】アボリボタンパク質B-100およびアボリボタンパク質A-Ⅰと免疫反応し、前記それぞれの指示手段に結合されないそれぞれの単クローン性パラトープ分子がそれぞれ別個に固相マトリックスに結合して別の固体支持体を形成し、前記支持体の表面非特異的結合部位がブロックされている、特許請求の範囲第(11)項記載の診断装置。

【請求項13】ATCC受託番号HB8746およびHB9200を有するハイブリドーマにより分泌された単クローン性パラトープ分子が個々の固体マトリックスに結合されている、特許請求の範囲第(12)項記載の診断装置。

【発明の詳細な説明】

## 20 技術分野

本発明は異常脂質代謝の標識に関する検定法に関し、詳しくは液体血液試料中のアボリボタンパク質B-100とアボリボタンパク質A-Ⅰとの比を測定する検定法および該方法を実施する診断装置に関する。

## 発明の背景

A.アテローム性動脈硬化およびリボタンパク質  
アテローム性動脈硬化は動脈の壁上に蓄積するコレステロールおよび他の脂質が大きなブロックを形成し、それが血液の流れを阻害し、凝塊の形成、動脈の閉塞および閉塞性血栓症または塞栓症疾患例えば心臓攻撃または発作の原因を生ずることができる疾患である。米国における全死亡の50%までがアテローム性動脈硬化およびその二次合併症により起される。

ヒトアテローム性動脈硬化は動脈の壁中の、コレステロールを含む選ばれた脂質、および細胞の蓄積と規定され、時間とともに閉塞性障害を生ずる。アテローム性動脈硬化の病因は多因性であり、臨床、病理遺伝および実験的証拠の大部分はリボタンパク質代謝の異常がアテローム性動脈硬化の発生の原因であることができるることを示唆する。これらの脂質はリボタンパク質と称される脂質-タンパク質複合体として血流中に運搬される。

アテローム性動脈硬化、特にその冠動脈疾患(CAD)として知られる形態は主要な健康問題である。アテローム性動脈硬化およびその関連血管疾患は1983年に983,000の死を起し、CAD单独が癌のすべての形態を合せたよりも多い年間死亡数を占める。米国において、百万以上の心臓発作が毎年起り、50万人以上がこの疾患の結果死亡する。直接的医療管理コスト中、CADコストは米国で毎年6千万ドル以上である。この莫大な代価は疾患を食す。

50 章、行動改善(運動)、および特定治療剤で制御できる

特許2656774

8

り包まれている。リン脂質は親水性頭が外側にあるように配列され、LDLを血液または細胞外液体中に水和懸濁状にあらしめる。

コレステロールは特異化LDL受容体を通してLDL上の細胞に送付され、細胞のコレステロール代謝を制御できるリソソーム中のLDL粒子から遊離される。細胞内コレステロールの蓄積は3プロセスを修飾する。

第1に、コレステロールの生合成経路中の段階を触媒する酵素、HMG-CoA還元酵素、の合成を止めることにより細胞自身のコレステロールを作る細胞の能力を低下する。酵素の抑制はLDLの受容体仲介吸収から説明される外部コレステロールに依存する細胞を残す。

第2に、到来LDL誘導コレステロールはリボタンパク質アシルトランスフェラーゼと称される酵素を活性化することにより細胞中のコレステロールの貯蔵を促進する。その酵素は脂肪酸を過剰のコレステロール分子にエステル化し、貯蔵小滴中に析出するコレステリルエステルを作る。

第3に、最も重要なことに、細胞内のコレステロールの蓄積が細胞に新LDL受容体の合成を停止させるフィードバック機構を説明する。細胞はそれによりその外部受容体の供給を調整し、細胞の変動する要求を満たすのに十分な、しかしそれを過負荷にするには不十分なコレステロールを細胞中に運ぶ。例えば、活動的に分裂し、新しい構造物を要求する線維芽細胞は約40,000のLDL受容体の最大供給毎細胞を維持する。成長中でない細胞中に到来コレステロールが蓄積し始め、フィードバック系が受容体製造を低下し、受容体の供給を10倍程度低下させる。

一方、他の循環リボタンパク質、高密度リボタンパク質(LDL)粒子はアテローム性動脈硬化の低いおそれに関連する高コレステロールの状態に関係があることが示された。アボリボタンパク質A-Iは構造タンパク質であり、HDL粒子の抗原である。HDLの量はアテローム性動脈硬化の予想発生率と逆相関を与える。

高密度リボタンパク質(HDL)は2つの主要アボリボタンパク質、アボリボタンパク質A-I(アボA-I)およびアボリボタンパク質A-II(アボA-II)を含む。アボA-Iは全量型HDLの主要タンパク質である。HDL粒子はすべてアボA-Iを含み、従って、HDLの先駆型化には通常アボA-Iの定義が含まれる。HDL粒子の約80%はまたアボA-IIを含むが、しかしアボA-IIのみを含むHDL粒子は記載されなかった。

アボA-Iの1つの機能は血漿酵素、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)の活性化である。この酵素は肝臓へ輸送するためのHDL上の遊離コレステロールのエステル化に必要である。アボA-Iが存在しないと血液中のコレステロールがエステル化されず、従ってコレステロールが血液から除去されない。アボA-IIにより作用されるHDL代謝中の特定役割は規

(4)

7

ようCADのおそれのある特定集団を確認する手段に対する配慮に集中した。

コレストロール関連血漿リボタンパク質粒子の4主クラスが規定され、脳または肝臓中にその由来を有する。これらの粒子はコレステロールおよびトリグリセリドを含む中性脂質の運搬体中に含まれる。全クラスの血漿リボタンパク質は脂質-タンパク質複合体に関連するアボリボタンパク質を有し、アボリボタンパク質はこれらのリボタンパク質の機能に必要な役割を演ずる。

第1のクラスはキロミクロンである。それらは最大のリボタンパク質であり、トリグリセリド中に多い。キロミクロンの由来の部位は脳である。

アボリボタンパク質はキロミクロン塊に直列に小さい部位であるが、アボリボタンパク質A-I、A-IIおよびA-IVはキロミクロンと有意に関連し、これらのAリボタンパク質の結合成が認められたと報告された。キロミクロンはまたアボリボタンパク質B-48を含有する。試験管内でキロミクロンを血漿または高密度リボタンパク質(HDL)に暴露するときにAタンパク質のキロミクロン補体の多くが失われ、CおよびEアボタンパク質が得られる。Aアボリボタンパク質(アボA)の誕生は脂肪吸引およびキロミクロン形成以外の因子により調節することができる。

次のクラスのリボタンパク質は超低密度リボタンパク質、VLDLである。VLDL粒子は肝臓内で作られ、トリグリセリド代謝および肝臓からのこれらの脂質の運搬体中に含まれる。アボリボタンパク質アボB-100およびアボEはVLDL粒子の主成分である。

第3のリボタンパク質は低密度リボタンパク質(LDL)と称され、VLDLの異化作用の特定生成物である。LDL粒子中の主アボリボタンパク質はアボリボタンパク質B-100、すなわちアボB-100である。

もう古典的なフラミンガム(Framingham)の研究(1971)の結果はCADのおそれと血清コレステロール濃度との間に明らかな相関を示した。この研究はまた高密度の低密度リボタンパク質(LDL)コレステロールがCADの高いおそれに関連することを示した。最近、リビド・リサーチ・クリニックス・コロナリ・プライマリー・プレベンション・トライアル(Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial)(1984)により行なわれた研究はコレステロールおよびLDLコレステロールの血漿濃度を食事および薬物を組合せた規制により低下できること、およびこの血漿コレステロールの低下がCAD致死の発生の低下を生じることを示した。

LDLは血漿中の主コレステロール運搬リボタンパク質である。LDLは脂質コアがそれぞれエステル結合により長鎖脂肪酸に結合しながら約1500分子のコレステロールからなる大きい球状粒子である。このコレステリルエステルのコアはリン脂質、非エステル化コレステロール分子およびアボリボタンパク質B-100の単分子の層によ

特許2656774

(5)

9

定されていない。

多くの研究は高HDL濃度がCADの低い発生率に相關することを示した。若干の著者はHDLがコレステロールを糸状部位例えば動脈壁から除去し、従ってHDLに対応する抗じゅく脂形成性に寄与することを推測した。HDLコレステロールの高い濃度は比較的正常な脂質代謝並びに心血管疾患の低発生および（または）低い症状に相關するが、LDLコレステロールの高い濃度は異常脂質代謝およびCADの高いおそれに関連する。脂肪過剰血（血中の過剰脂質）を有する患者およびCADに対する特定おそれのある患者の適当な管理のためにLDLおよびHDLコレステロールの濃度をしばしば測定することが望ましい。今日までHDLコレステロールの検定は厄介で、HDLの血中濃度に測定に正確でなかった。

#### B.リボタンパク質の構造および機能

コレステロールが血漿中に遊離で存在しないが、しかしリボタンパク質により体中の組織部位に輸送されることを理解することが重要である。コレステロールは直接細胞合成から、または食事により得ることがある。しかし、コレステロールは肝臓によってのみ宿主から除去されることができ、そこで胆汁酸に転化され、排出される。

キロミクロンは食事コレステロールおよびトリグリセリドを次のプロセッシングのために肝臓へ運ぶが、LDLはコレステロールを冠動脈を含む肝外組織に送付する。従って、リボタンパク質LDL/アボB-100は糸状組織に対する「悪性」コレステロールの沈着物中に含まれる。逆にリボタンパク質、HDL/アボAは組織から「良性」コレステロールを除き、コレステロールを排出するために肝臓へ戻す。

歴史的に多くの系がリボタンパク質の分離および確認のために開発された。これらの技術は通常リボタンパク質粒子の物理化学的性質に基く。最もしばしば使用される2つの技術は超遠心分離および透析泳動である。

分画密度勾配超遠心分離はリボタンパク質が他の血漿タンパク質より軽いかまたは密度の小さい空室を利用して、比較的容易であるが、しかしキロミクロン（最も軽いリボタンパク質）、VLDL、LDLおよびHDLをそれぞれ他から分離するには時間がかかりかつ厄介である。電気泳動法は高脂肪血症の患者の分類に有用であった。しかし、これらの方針は普通の臨床研究所で容易に行なわれない。

血中コレステロールまたはトリグリセリドの単純な定量は特定リボタンパク質がこれらの脂質を運ぶことに関連する情報およびそれらの定量を医師に提供しないこともまた知ることができる。

#### C.血漿リボタンパク質

4つの主要クラスの血漿リボタンパク質：すなわちキロミクロン、VLDL、LDLおよびHDLが規定され、またこれらの中にサブクラスが明らかに存在する。すべてのリ

10

ボタンパク質はその由来を謁または肝臓あるいはその両方に有し、ブゾイドミセラ構造を有すると思われる。中性脂質、特にコレステロールエステルおよびトリグリセリドはリボタンパク質のコア中に表面活性成分、アボリボタンパク質およびリン脂質、との相互作用により可溶性で安定な形態に維持される。

非エステル化コレステロールもまたこれらの複合体中に存在する。その極性は中性脂質（コレステロールエステルおよびトリグリセリド）の極性と一層極性のアボリボタンパク質およびリン脂質の極性との間にあり、コアおよび表面の両方に認めることができる。

アボリボタンパク質、非エステル化コレステロールおよびリン脂質からなる外部表面はコレステロールエステルおよびトリグリセリドの水不溶性ニアを包囲し、魚極性脂質を水性環境から保護する。この一般的構造概念は小角X線散乱研究により、および種々のプローブをリボタンパク質の構造の調査に用いた他の物理的方法により支持された。従って血漿リボタンパク質の重要な機能は中性脂質の可溶化および輸送である。

#### D.アボリボタンパク質

アボリボタンパク質は、分離した無側リボタンパク質を有機溶媒、界面活性剤またはカオトロビック試薬による処理により得られる血漿リボタンパク質の脂質を含まないタンパク質成分である。リボタンパク質で指摘されるすべてのタンパク質がすべて脂質輸送における役割を有するとは限らない。適切な例は血清アミロイドAタンパク質、鋭敏な相応物、がHDLに結合して血漿中に輸送されるとする最近の認識である。これらの低分子量タンパク質は炎症状態で30%までのアボHDLを含むことができるが、しかしそれらが特定の脂質輸送役割を有することは疑わしい。

##### (1) アボリボタンパク質A-I

###### (a) タンパク質

アボリボタンパク質A-I（アボA-I）は本発明における核心のタンパク質である。アボA-Iが次に論議される。

アボA-Iはすべての血清HDLの主要タンパク質成分であり、すべてのHDL粒子中に存在し、HDL粒子当たり多数、例えば7~8個、のアボA-I分子が存在する。キロミクロン、VLDLおよびLDL中に比較的少量存在しましたHDLの全タンパク質質量の約50~80%を構成することが報告された。

アボA-Iは243~255残基の単鎖からなり、シスチン、システイン、ロイシン、または炭水化物を含まず、若干のイソ形態で存在する。アボA-Iは脂質を含まない状態で約55%のらせん含量を有し、それはリン脂質を結合すると約75%に増加する。11個のヘリカル残基の反復サイクルがこのアボリボタンパク質中に確認された。これらの単位が遺伝子重複により22残基反復単位を50 生じた単純区段を表わすことが示唆された。これらの單

特許2656774

(6)

11

位が密配列相同性を有し、タンパク質の脂質結合領域を表わすと思われる。

アボA-1はLCAT、コレステロールおよびホスファチシルコリンのそれぞれのコレステリルエステルおよびリゾホスファチジルコリンへの転化を触媒する血漿酵素、の強力な活性化因子である。アボA-1の特定脂質-結合領域がLCATを活性化し、この活性が脂質結合の性質に関連したことが報告された。既に記載したように肝臓および腸がアボA-1を合成するが、しかし全血漿含量に対するその相対的寄与およびアボA-1の生成を修飾する因子は十分に規定されていない。

典型的には、血漿アボA-1の約90%以上がHDLに関連し、約1%未満がVLDLおよびLDLに関連し、約10%またはそれ未満が血漿のリポタンパク質を含まない部分に関連する。各粒子型中のアボA-1の量はデータの報告者で異なり、粒子の分離に用いた方法の間数であると思われる。

(b) アボA-1リポタンパク質の臨床的重要性HDL、アボA-1の主タンパク質成分の測定は臨床的に重要である。多くの研究の結果アボA-1の濃度がCADを有する被験者中に低下することが示された。この観察はこの患者群中の血漿アボA-1の保護役割を強調する。

若干の研究の結果は、アボA-1濃度を正確に測定することにより異常脂質代謝、アテローム性動脈硬化に対する、特にCADに対する個体の予後を予測できることを示唆する。2416名の子供の最近の調査に対してフリードマン(Freedman)ほか、(1986)、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(New Eng. J. Med.)、315:721~726が参考される。しかし、アボA-1単独の量は、単にその測定の正確さおよび精度における困難のためであるとしても、異常脂質代謝に対する標識として利用できなかった。従って、比較的高いアボA-1濃度が正常脂質代謝、および比較的低い濃度で異常脂質代謝およびCADと相關する傾向があるけれども、正常なヒトと既知CADを有するヒトとの間の明瞭な境界線は報告されなかった。

前記のように、アボA-1は臨床的に有用な免疫検定系例えば放射免疫検定(RIA)、酵素結合抗体免疫検定(ELISA)、電気免疫検定(EIA)、放射免疫拡散(RID)において、および免疫比濁法(INA)により正確かつ精密に定量することが非常に困難であると認められた。例えば、種々の方法を用いて報告された値の分散に対するスタンバーグ(Steinberg)ほか、(1983)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、29:415~426の表1参照。

これらの分析の困難性に対して主張された理由の1つはアボリポタンパク質A-1分子が血漿および血清中に大きい生化学的に不均質な粒子の部分として存在し、その中に若干の抗原部位(エピトープ)が隠蔽され、マスクされることである。その結果、若干の研究者は通常隠

12

蔽されたエピトープをアンマスキングし免疫反応に利用できるようにそれらの試料に対するアンマスキング処理を用いた。

スタンバーグ(Steinberg)ほか、(1983)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、29:415~426はまた血液試料例えは血漿または血清を変性剤例えは尿素、テトラメチル尿素およびグアニシン、界面活性剤例えはドデシル硫酸ナトリウムおよびポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウラート(ツイーン20)、加熱例えば52°Cで3時間および37°Cで2時間、および脱脂質有機溶媒例えはエタノールとジエチルエーテル、メタノールとジエチルエーテル、クロロホルムとメタノールなどの混合物で処理することによるアンマスキングを論議している。他の特定のアンマスキング処理はマシーコ(Maciejko)ほか、(1982)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、28:199~204(界面活性剤)；コレン(Koren)ほか、(1985)、クリニカル・シミカ・アクタ(Clin. Chim. Acta)、147:85~95(有機溶媒)；およびバーリ(Bury)ほか、(1985)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、31:247~251(37°C、2時間)により報告された研究に見出すことができる。

上記研究者などの若干はまた血漿および血清中に存在するアボA-1の明らかな不均質性の回避を助けるため多クローン性抗体調製物を用いた。マシーコ(Maciejko)ほか、(1982)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、28:199~204;コレン(Koren)ほか、(1985)、クリニカル・シミカ・アクタ(Clin. Chim. Acta)、147:85~95;バーリ(Bury)ほか、(1985)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、31:247~251、およびフェスマール(Fesmire)ほか、(1984)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、30:712~716。もちろん、臨床的に有用な定性免疫検定における多クローン性抗体の使用はそれとともに若干の動物の血清の使用に伴なう抗体活性の差異および異なるバッチの血清の免疫特異性の差異の障害を伴なう。

一方、ここに用いる単クローン性バラトープ分子を別にして、多くの研究者はHDL粒子およびアボA-1と実質的に等しく免疫反応し、並びに試料中のHDL上に存在する実質的にすべてのアボA-1と免疫反応する単クローン性抗体を記載しなかった。従って、カーティス(Curtiss)ほか、(1985)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、260:2982~2998はアボA-1およびHDLとはほぼ等しく免疫反応したが、しかし検定した試料中に存在することが知られた放射性標識したアボA-1またはHDLの単に約60%を免疫沈降できたAI-7と称された1つの単クローン性抗体を報告した。

2.アボリポタンパク質B-100

(a) タンパク質

50 アボリポタンパク質B-100(アボB-100)と称され

## 特許2656774

(7)

13

た肝臓中で合成されたアポBの恒常性LDL受容体により確認され結合される。アポB-100を結合することによりこれらの受容体はLDL粒子を結合し、それを血漿から抽出する。LDLはそれにより細胞中に取込まれて破壊され、そのコレステロールを生じて各細胞の要求に役立たれる。従ってアポB-LDL受容体相互作用が血流からのLDLコレステロールの除去に主要役割を演じ、LDL粒子はすべてアポB-100を含有する。

(b) アポB-100リボタンパク質の臨床的意義アポA-IおよびHDLとは対照的に、アポBの高い濃度は異常脂質代謝およびCADに関連したが、低い量は高齢および疾患の低いおそれと相関する傾向がある。キロミクロン粒子はアポリボタンパク質B-48として示される主要アポBタンパク質を含み、それはまたアポB-100遺伝子の生成物であり。(ヤング(Young)ほか、(1986)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、261:2995~2998)、アポB-100と少くとも1つの交差反応性エピトープを共用する。VLDLおよびLDL粒子はアポB-100を含有する。2つのタンパク質中、アポリボタンパク質B-100(アポB-100)は異常脂質代謝およびCADに対し一層重要であると思われる。

最近若干の研究者はアポB-100の血漿濃度が血漿LDLコレステロール濃度よりも一層CADのおそれを示すことができる事を示唆した。スナイダーマン(Snideman)ほか、(1980)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci.) USA、77:604~608、HDLおよびアポA-Iに対する場合のように、アポB-100またはLDL単独の濃度から異常脂質代謝を有するかまたはCADのおそれの高いヒトを確認できる明らかな境界線が決定されなかった。

特定の抗体含有抗血清を用いる血漿アポタンパク質Bに対する多くの型の免疫検定法が競合的液相および固相RIA、ELISA、RIDなどを含めて報告された。これらのアポB免疫検定の広汎な適用を制限する問題は再現性並びに用いる抗血清の品質および特異性であった。種々の型のアポB検定法それぞれの方法論的問題の総説はカーレイ(Currey)ほか、(1978)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、24:280~286およびロセニー(Roseneu)ほか、(1983)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、28:427~433に見出される。

若干の研究者は抗原構造およびリボタンパク質代謝中の役割の研究に用いるヒトアポBに対する单クローニング抗体のパネルの開発を報告した。さらに、液相RIAにおける血漿アポB濃度の測定に対する抗アポB单クローニング抗体の使用が報告された。パトン(Patton)ほか、(1983)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、29:1898~1903;メイナード(Maynard)ほか、(1984)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、30:1620~1624およびヤング(Young)ほか、(1986)、クリニカル・ケミストリー(Clin. Chem.)、32:1484~1490。さら

14

に1グループは血漿アポBに対する放射免疫拡散検定における抗アポB单クローニング抗体の混合物の使用を報告した。マルコンビナ(Marconvina)ほか、(1985)、クリニカル・シミカ・アクタ(Clin. Chim. Acta)、147:117~125。しかしこれらの検定法は長時間のインキュベーション、反復遠心分離および(または)放射性物質の使用の必要に悩まされる。

(3) アポA-IおよびB-100に対する試薬としての单クローニングバラトープ分子

19 ヒト血清試料中のアポA-IまたはB-100の存在を検定する試薬として单クローニング抗体またはそれらの抗体結合部位、すなわちバラトープ分子の使用は、一度得られるとそのような試薬が不变の品質で比較的多量に生成でき、従って单クローニング抗体に関連する不一致の問題が回避されるので魅力的である。しかし、特定の单クローニングバラトープ分子をそのような検定系における成分として使用することを妨げる多くの因子が存在する。

典型的な单クローニングバラトープ分子として单クローニング抗体を用いると单クローニング抗体がその標的抗原の抗原不均質性のために有用であるには免疫特異性でありすぎることができることが教示されている。例えば、普通の多クローニング抗体含有抗血清の特異性はアポA-I検定において有用であると認められたように抗原タンパク質の大部分またはすべてを網羅する抗原決定基に結合する何十万もの種々の抗体の共通に存在する。その結果、遺伝子の多形性、グリコシル化の不均一性あるいは他の変性または他の反応に基く抗原の構造の小変化が通常多クローニング抗体の結合に対して有する影響が小さい。同様に、多クローニング抗体からの中の抗体の一層大きいまたは小さい亜集団は通常修飾または変性された抗原を結合する。

対照的に、单クローニング抗体は通常抗原分子上の1抗原決定基(エピトープ)に結合する。何かの理由でその決定基が変更されると抗体は結合を続けることができるかまたは続けることができない。これが問題であるかまたは利点であるかは個々の環境による。この場合のように单クローニング抗体をアポリボタンパク質に対する診断検定に用いるとすれば、そのタンパク質における小さい抗原変位が大きい誤差を生ずる。従って、例えばツアオ(Tsao)ほか、(1982)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)、257:15222~15228およびマオ(Mao)ほか、(1983)、29:1890~1897はアポB分子に特異性の若干の单クローニング抗体が全LDL粒子上に発現されないエピトープに結合することを報告した。そのような抗体は明らかに血漿または血清中の全アポB-100の定量に有用ではない。

アポタンパク質A-Iの抗原不均質性は前に論議した。アポB-100の不均質性もまた十分に文献に記載された。例えばアポB上のエピトープの発現は(i)関連

(3)

15

脂質の組成、(ii) 免疫反応の温度、(iii) その自然環境からのLDLの分離程度、および(iv) 個体間の遺伝子発現、により修飾されることが認められている。

第2に、それらの特有の特異性のために、単クローナル性抗体(Mab)の満足すべき使用はしばしば標的抗原に対するその親和性に依存する。例えば、Mab自身が液相にある間はMabが液相および固相の抗原の結合に有用な十分な親和性を有するけれども、その同じ抗体が溶液からの抗原に対する結合および保持に有用な固相結合抗体として有用であることができない。

上記問題は単クローナル性抗体の使用に一般的である。従って当業者はそれらを使用する検定系において単クローナル性抗体を試験し、確認することが必須であることを認めた。ゴッディング(Godina, James W.、「単クローナル性抗体：原理および診察(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice)」)、アカデミック・プレス(Academic Press, New York)、(1983)、40~46頁。

#### 発明の概要

本発明は異常脂質代謝の標識に対して検定する改良法およびその方法を実施するための、典型的にはキット形態における診断装置を指向する。そのような検定において、ヒト血液試料の単位容積中のアボリボタンパク質B-100およびアボリボタンパク質A-Iの量が測定され、アボリボタンパク質B-100とアボリボタンパク質A-Iとの比が無単位数として測定される。

本発明はアボリボタンパク質B-100含有ヒト液体血液試料の第1アリコートを、アボリボタンパク質B-100と免疫反応する、かつATCC受託番号HB8742またはHB8746を有するハイブリドーマの1つにより分泌される固相に結合した第1単クローナル性パラトープ分子を有する固体マトリックスから実質的になる固体支持体と混合して固-液相混合物を形成することにより第1液体試料アリコートをアボリボタンパク質B-100の量について検定することを含む。固体支持体の表面は非特異的タンパク質結合部位をブロックされている。その混合物は生物学的検定条件下に、第1パラトープ分子が試料アリコート中に存在するアボリボタンパク質B-100と免疫反応し、試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質B-100を含む固相結合免疫反応物を形成するのに十分な予定時間保持する。

前記第1液体試料アリコート中のアボリボタンパク質B-100はまたアボリボタンパク質B-100と免疫反応する、かつATCC受託番号HB8742またはHB8746を有するハイブリドーマの1つにより分泌されるがしかし前の混合段階に使用されない、すなわち固相結合パラトープ分子として使用されない前記2つの他のハイブリドーマにより分泌された単クローナル性パラトープ分子であり、酵素指示手段に作用可能に結合された液相第2単クローナル性抗体と混合して第2混合物を形成する。その第2混合物は生物学的検定条件下に、第2パラトープ分子が試料アリ

特許2656774

16

コート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質B-100と免疫反応物を形成するのに十分な予定時間保持する。両パラトープ分子の混合および免疫反応物の形成後に生ずる固相と液相を分離し、分離した固相中に存在する指示手段結合アボリボタンパク質B-100含有免疫反応物の量およびそれにより試料の単位容積中のアボリボタンパク質B-100の量を測定する。

好みしい整縫において前記2つの混合段階が実質的に同時に進行なれ、2つの保持段階が一緒に進行なれる。

従って第1パラトープ分子および第2酵素結合パラトープ分子が実質的に同時に試料と混合され、生ずる固-液相混合物は、両パラトープ分子が試料中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質Bと免疫反応するのに十分な時間保持される。

アボリボタンパク質A-Iを含み、アンマスキング処理のないヒト液体血液試料の第2アリコートを第2の検定に用いる。これに申し、第2液体試料アリコートを、アボリボタンパク質A-Iと免疫反応する、かつATCC受託番号HB9200またはHB9201を有するハイブリドーマの1つにより分泌される固相に結合した第3単クローナル性パラトープ分子を有する固体マトリックスから実質的になる固体支持体と混合して第3固-液相混合物を形成する。固体支持体の表面または非特異的タンパク質結合部位をブロックされている。第3固-液相混合物は生物学的検定条件下に、第3パラトープ分子が試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質A-Iと免疫反応し、試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質A-Iを含む固相結合免疫反応物を形成するのに十分な予定時間保持する。

アボリボタンパク質A-Iを含む同一第2液体試料アリコートを、アボリボタンパク質A-Iと免疫反応する、かつATCC受託番号HB9200またはHB9201を有するハイブリドーマの1つにより分泌され、先の混合段階で使用されない、すなわち固体の一部として使用されたもの以外のパラトープ分子であり、酵素指示手段に使用可能に結合した液相第4単クローナル性パラトープ分子と混合して第4混合物を形成する。第4混合物は生物学的検定条件下に、第4指示手段結合パラトープ分子が試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質A-Iと免疫反応物を形成するのに十分な予定時間保持する。前記パラトープ分子の両方の混合および免疫反応物の形成後生ずる固相と液相を分離し、分離した固相中に存在する指示手段結合アボリボタンパク質A-I含有免疫反応物の量およびそれにより試料の単位容積中のアボリボタンパク質A-Iの量を測定する。

また上記2つの混合段階を実質的に同時に進行なうことおよび上記2つの保持段階を一緒に進行なうことが好みしい。従って再び、固相結合パラトープ分子、酵素結合パラトープ分子および試料アリコートが実質的に同時に混合され、固相と液相を分離するまで保持される。

(9)

特許2656774

17

殊に好ましい感覚において、アボリボタンパク質B-100およびアボリボタンパク質A-1に対する前記検定が好ましい感覚で行なわれ、各検定において固相結合単クローニ性バラトープ分子、液相酵素指示手段結合単クローニ性バラトープ分子および試料アリコートは実質的に同時に混合され、次いで各混合物中の両バラトープ分子が各混合物中に存在する実質上すべてのそれぞれのアボタンパク質B-100およびA-1と先免疫反応するのに十分な時間保持される。

前記検定のいずれにおいても、初めて挙げた固相結合単クローニ性バラトープ分子がATCC受託番号HB3746を有するハイブリドーマにより分泌されるものであること、および第3の固相結合バラトープ分子がATCC受託番号HB9200を有するハイブリドーマにより分泌されるものであることが好ましい。

本発明の他の観点は、典型的にはキット形態における診断装置を構成する。そのような装置は各アボB-100とアボA-1との比の1測定を行なうのに十分な量存在する前記単クローニ性バラトープ分子の1つを有する少くとも別のパッケージまたは容器を含む。アボB-100と免疫反応するバラトープ分子の対の1つおよびアボA-1と免疫反応するバラトープ分子の対の1つは酵素指示手段に作用可能に結合される。

より好ましくは、それぞれの指示手段に結合されない、それぞれの単クローニ性バラトープ分子は各別個に固相マトリックスに結合させて個々の固相支持体を形成させる。それらの支持体のそれぞれの表面は非特異的タンパク質結合部位をロックされる。それらの固体支持体の固体マトリックスはそれぞれのバラトープ分子のための容器またはパッケージを構成する。

バラトープ分子がそれを診断装置に含む容器を有するとして番号、すなわち第1、第2、第3および第4、を与えられたけれども、それらの番号は単に確認のために用いられ、それらのバラトープ分子を試料アリコートに混合するかまたはパッケージ内容物を用いる順序を示していないことを理解すべきである。同様に前記混合物を混合するバラトープ分子に類似する番号を与えたが、しかしそれらの混合物を記載した順序で形成する必要がないことを理解すべきである。従って、例えば第3および第4の単クローニ性バラトープ分子との前記第2アリコートの混合物は第1および第2バラトープ分子との前記第1アリコートの混合前の間に生ずることができる。同様に、既に記載したように、第1および第2バラトープ分子を実質的に同時に混合することができる。

本発明は若干の利益および利点を有する。後記検定法の使用により冠動脈疾患(CAD)と相關する異常脂質代謝に対する標識を得ることができそれが正確かつ信頼性である事実である。

本発明の他の利益および利点はその検定が所望の正確さおよび精度で比較的短時間に、例えば空むならば約1

10

18

時間の時間内に行なうことができることである。

なお他の本発明の利益および利点はその方法がアボB-100、アボA-1および比標識に対する非常に正確かつ精密な測定を与えるけれども、それらの測定が放射性元素の使用およびそのような元素の使用が通常与える傷害を伴なわないで達成されることである。

なお他の本発明の利益および利点は以下の本発明の詳細な説明から当業者に明らかであろう。

#### 図面の簡単な説明

開示の一部を形成する図面において、

第1図は液相放射免疫検定(RIA)における単クローニ性抗体MB47のモル濃度(横軸;AB濃度(MB47))の増加により結合された<sup>125</sup>I標識LDL粒子(縦軸)の百分率を示すグラフである。

LDLは10被験者のプールした血漿(….)から、または1正常脂肪血被験者(-)から調製した。血漿は約12時間の絶食時間後被験者の血漿漏出により得た。

第2図には2つのグラフが含まれる。グラフAは既知一定量の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識MB47(HRPO-MB47)分子の、増加量のMB24分子の存在下に固相付着試薬アボB-100と先免疫反応する能力を示す。横軸は相対光学密度単位であり、横軸は結合物として加えた非標識抗体タンパク質のミクログラム毎ミリリットル(μg/ml)の単位である。

一定量(20 μg)のHRPO結合MB47分子を非標識MB47

(●)または非標識MB24(▲)分子の増加量および固相結合試薬アボB-100(LDL)と実質的に同時に混合した。混合物を3時間25°Cで保持し、それによりMB24およびMB47バラトープ分子を試薬アボB-100と免疫的に反応させて固相結合先免疫反応物を形成した。次いで固相結合標識MB47の量を物質および方法のセクションの競合的ELISAに記載したように検定した。

グラフAは免疫反応物中の非標識MB47バラトープ分子の増加量の存在が相応して固相免疫反応物として結合した標識MB47分子の量を低下することを示す。従って非標識MB47がLDLに対して標識MB47と競合する。

グラフAはまた非標識MB24分子の増加量が固相免疫反応物として結合した標識MB47の量を実質的に低下しないことを示す。従って非標識MB24はLDLに結合する標識MB47分子と競合しない。

グラフBはHRPO標識MB24分子および非標識MB47分子を用いて得た同様の結果を示す。従ってMB47およびMB24バラトープ分子はアボB-100の表面上で十分離れ、他の結合と立体的に競合してそれを阻害することなく両分子を単個アボB-100分子に対して結合させる異なるエピトープに結合する。

第3図にはAおよびBの2つのグラフが含まれる。グラフAは既知一定量(0.375 μg/ml)の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識AI-10分子の非標識AI-10(▲)およびAI-11(■)分子の増加量の存在下に固相付着試薬ア

50

(10)

特許2656774

19

ボA-1と免疫反応する能力を示す。液滴は光学密度単位であり、液滴は添加非標識抗牛单クローニ性抗体のミクログラム( $\mu\text{g}$ )単位である。この研究は第2図に論じたものに類似し、その詳細は物質および方法のセクション中に与えられる。

グラフAは免疫反応複合物中の非標識AI-10分子の増加量が相応して固相免疫反応として結合した標識AI-10の量を低下することを示す。従って、非標識AI-10がアボA-1に対して標識AI-10と競合する。

グラフAはまた非標識AI-11分子の増加量が固相免疫反応物として結合した標識AI-10分子の量を有意に低下しないことを示す。従って非標識AI-10分子がアボリボタンパク質A-1に結合する標識AI-10分子と競合しない。

グラフBは類似の結果が一定量(0.375  $\mu\text{g/ml}$ )のHRP標識AI-10分子並びに非標識AI-11分子(■)およびAI-10分子(▲)で、抗原としてHDLを用いて得られることを示す。従ってAI-10およびAI-11分子は、アボA-1の表面またはHDL上のアボA-1上で十分に離れ、両单クローニ性抗体分子の単個アボA-1分子に対し他の結合と立体的に競合してそれを阻害することなく結合させ異なるエピトープに結合する。

#### 発明の詳細な説明

##### I 一般的論議

###### A 定義

「抗体」という語は抗原と特異的に結合できる免疫グロブリンと称されるグリコシリ化タンパク質の群の一員である。そのような抗体はその抗原と、抗原の抗原決定基と抗体の抗体結合部位との間の特異的免疫結合相互作用により結合する。

「抗体結合部位」は抗原を特異的に結合する重ねおよび軽鎖可変および超可変部からなる抗体分子の構造部分である。ジャー・ネ(Jerne)(1974)、アナース・ド・イムノロジー(Ann. Immunol. (Inst. Pasteur))、125C:373~389の命名を用い、抗原結合部位は通常ここに「パラトープ」として示される。

抗体の抗体結合部位含有(パラトープ分子含有)ボリペプチド部分はパラトープを含み、抗原に結合する抗体分子の部分であり、例えば抗体のFab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>およびF(v)が含まれる。抗体のFabおよびF(ab')<sub>2</sub>部分はよく知られた方法による実質的に無傷の抗体上のそれぞれペプチド結合の還元、次いで生じたタンパク質分解反応により調製される。例えばテオフィロボラスほか(Theophilopoulos and Dixon)に対する米国特許第4,342,566号参照。Fab'抗体部分もまたよく知られ、例えばメルカブトエタノールによる二重鎖部分を結合するジスルフィド結合の還元、次いで生じたタンパク質メルカブタンの試薬例えばヨードアセトアミドによるアルキル化によりF(ab')<sub>2</sub>部分から生成される。無傷抗体が好ましく、本発明の单クローニ性リガンド分子の例と

20

して使用される。

「抗原」という語は歴史的に抗体により結合されるエンティティーを称するため、また抗体の生成を誘導するエンティティーを称するために使用された。より最近の用法は抗原の意味を抗体により結合されるエンティティーに限定し、「免疫原」という語が抗体生成を誘導するエンティティーに対して使用される。ここに論議するエンティティーが免疫原および抗原の両方である場合に、それは一般に抗原と称される。

「抗原決定基」という語は抗体結合部位により免疫的に結合される抗原の実際の構造部分を示す。ジャー・ネ(Jerne)の命名は抗原決定基を「エピトープ」として再規定する。

「生物学的活性」という語は少くとも抗原または特異抗体結合部位を特異的に結合するタンパク質分子の能力を示すが、他の一般的またはエフェクター能力もまたその分子中に存在することができる。

抗体結合部位を含むパラトープ分子の生物学的活性は水性媒質中で混合するとパラトープ(抗体結合部位)とそのエピトープ(抗原決定基)との少くとも生理的pH値およびイオン強度において免疫反応物を形成する免疫反応により証明される。好ましくは、生物学的活性は生物学的検定条件すなわち本発明に有用な单クローニ性パラトープ分子を焼打5~約9のpH値範囲内で例えば蒸留水ないし約1モルの塩化ナトリウムのイオン強度で、約4~約45°Cの温度でエピトープ(抗原決定基)に結合させる条件下に生ずる。ここに有用な单クローニ性パラトープ分子はすべて生物学的に活性である。

「ELISA」は固相に結合した抗原または抗体および酵素-抗体または酵素-抗原結合体を用いて試料中に存在する抗原または抗体の量を検出し、定量する酵素結合抗体免疫検定を示す。ELISA技術の記載は1982年にラング・メディカル・パブリケーション(Lange Medical Publication, Los Altos, CA)により発行されたサイテス(D.P.Sites)ほかによる「基礎および臨床免疫学(Basic and Clinical Immunology)」、4版、22章、並びに米国特許第3,654,099号、第3,850,752号、および第4,016,043号中に見出され、それらがここに参照される。

「酵素」はしばしば特異的である基質中で若干の変化を接触作用により促進または生成できるタンパク質を示す。

用いた「免疫反応物」という語は免疫反応の生成物、すなわち抗原が抗体またはパラトープを含む分子により免疫的に結合されるときに生ずるエンティティーを示す。従って免疫反応物は分子間に形成される特定の型の複合体である。

「指示手段」、「酵素指示手段」または「標識」という語は種々の文法形態同様に使用され、存在を示す検出可能なシグナルの生成中に直接含まれる酵素を示す。酵素標識に結合するとパラトープ分子はまたしばしば酵

(11)

特許2656774

21

系結合パラトープ分子として示される。

「全抗体」という語は細胞により分泌された完全な抗体分子を、エピトープとの免疫反応における生物学的活性に必要なパラトープを含む他の小分子と区別するため用いる。

本発明に有用なパラトープ分子は単クローニ性パラトープ分子である。「単クローニ性抗体」(Mab)はただ1種の抗体分子を分泌するハイブリドーマのクローニにより生成される抗体であり、単クローニ性パラトープ分子は後記のように単クローニ性抗体またはそのパラトープ含有ポリペプチド部である。ハイブリドーマ細胞は抗体生成細胞および骨髄細胞または他の自己永続性細胞系から融合される。そのような抗体は最初にコラーほか(Kohler and Milstein)、ネーチャー(Nature)、25 6, 495~497 (1975)により記載され、その記載がここに参考される。

「単クローニ性パラトープ分子」および単に「パラトープ分子」という語はここに同義に、集合的に使用され、単クローニ性抗体の結合部位を含む分子の簇を示し、全単クローニ性抗体、実質的に完全な単クローニ性抗体および単クローニ性抗体の抗体結合部位含有部分が含まれる。MB47、MB24、AI-10およびAI-11と称される全単クローニ性抗体は、パラトープを含む全抗体の部分であるので本発明のパラトープ分子である。「単クローニ性パラトープ分子」または「パラトープ分子」という語は、上記単クローニ性抗体のパラトープ分子を含む一般生物学的活性分子を意味するときにのみ使用される。「パラトープ分子」という語とともに、またその語のないMB47、MB24、AI-10およびAI-11という名は、ハイブリドーマATCCB8742、HE3746、HB9200またはHB9201により生成された特異全抗体を意味する場合に使用される。

「分泌」および「生成」という後はしばしば抗体分子が得られる細胞に関して同義に使用される。しかし抗体を生成する細胞はそれらの分子をそれらの環境中へ分泌しないことができる。ここに開心のハイブリドーマ細胞は単クローニ性抗体をそれらの環境中へ分泌する。しかし、そのような細胞はしばしば「抗体生成」細胞として示され、それらの抗体はしばしば技術的に用いられる語に合せて「生成」されるとして示される。上記抗体のパラトープ含有ポリペプチド部分は同様に「生成」または「分泌」されるとして示されるが、しかしそのような分子がそれ自体「生成」または「分泌」される抗体から調製されることを理解すべきである。

「上澄み」および「上澄み液」という語はここに同義に使用され、細胞を培養する試験管内液体培地を示す。開心のハイブリドーマの培養により生成された単クローニ性抗体はそれらの培地環境中へ分泌される。従ってこれらの細胞に対する培地上澄みは単クローニ性パラトープ分子の好ましい源の1つであり、よく知られた方法によりハイブリドーマ細胞から分離して容易に得られる。

22

典型的なそのような技術は液体培地から細胞を沈降させる低速遠心分離である。単クローニ性パラトープ分子はまたハイブリドーマ組織を導入した実験動物の腹水腫瘍液(腹水)から得ることができる。両方法が後記される。

免疫反応複合物を形成するための3つまたはそれ以上の抗原およびパラトープ分子成分の混合に開通して使用した「実質的に同時に」という語は、相互の約15分以内、好ましくは成分の任意の2つの複合の約5分以内にすべての成分が単一混合物中に存在し混合させることを意味する。

免疫反応物を形成するパラトープ分子とそのLDLとしてのアポリボタンパク質B-100またはHDLとしてのアポリボタンパク質A-1の抗原との免疫反応に開通して用いた「実質的にすべて」という語はパラトープ分子が過剰に存在するときにパラトープ分子が溶液中に存在する抗原の少くとも約90%と免疫反応して免疫反応物を形成することを意味する。好ましい実施において、パラトープ分子がまた過剰に存在するときにパラトープ分子が存在する抗原分子の95%以上と免疫反応物を形成する。

B.ハイブリドーマおよび単クローニ性パラトープ分子  
本発明は4ハイブリドーマにより分泌される2対の2パラトープ分子を用いる。1対のパラトープ分子はアポリボタンパク質B-100と免疫反応する。他の対はアポリボタンパク質A-1と免疫反応する。

アポB-100と免疫反応するパラトープ分子を分泌するハイブリドーマは研究室呼称HL130C2.3C5およびV82A.6.1G4をもち、それらのハイブリドーマにより分泌された全単クローニ性パラトープ分子は通常ここにそれぞれMB47およびMB24として示される。それらのハイブリドーマにより分泌されたパラトープ分子のそれぞれが約90%以上の<sup>125</sup>I-LDLと、およびアポB-100上の異なる別の保存抗原決定基と免疫反応する。第2図のグラフAおよびBの試験により知見されるように、MB47およびMB24パラトープ分子はともにアポB-100に結合し、それぞれ他の免疫反応を実質的に阻害しないように結合する。ヤング(Young)ほか、(1986)、クリニカル・ケミストリー(Clin.Chem.)、32(18):1484~1490に指摘されたように、MB47はアポB-100とのみ反応し、MB24はアポB-100並びにアポB-48とまた後記のようにアポB-26、アポB-100のフラグメント、と交差反応する。

第2の対のハイブリドーマは研究室呼称H91H4.2H8およびH103D8.1D11をもち、それぞれAI-10およびAI-11と称されるパラトープ分子を分泌する。これらのパラトープ分子AI-10およびAI-11はそれぞれA-1上の保存抗原決定基と免疫反応し、また固相ELISAにおいて約90%以上の<sup>125</sup>I-HNL粒子と免疫反応する。第3図のグラフAおよびBの試験から知見されるように、両パラトープ分子AI-10およびAI-11はアポA-IおよびHDLと結合するが、しかし相互の結合を実質的に妨害しない。

特許 2656774

(12)

23

前記4ハイブリドーマはそれぞれアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション [American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD] に特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するプラベスト条約に従って寄託された。

ハイブリドーマ	ペラトープ分子呼称	ATCC登録番号	寄託日
V82A6, IgG	MB24	HB8742	3/6/85
HL130C2, 3C5	MB47	HB8748	3/6/85
H91H4, 2H8	AI-10	HB9200	9/16/86
0103D8, LD11	AI-11	HB9201	9/16/86

上記寄託は、寄託の待機期間が寄託の日から30年または寄託に対する最新の請求後5年あるいはこの出願から生ずる米国特許の主張期間のいずれか長い期間であるプラベスト条約の要件に従って行なわれた。ハイブリドーマは寄託当局において生存していないくなれば再寄託され、この出願の特許が発行されるとATCCにより公衆に利用可能になれる。

先にカーティス (Curtiss) ほか、(1982)、シャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J.Biol.Chem.)、257:15213~15221にはハイブリドーマHB8742により生成されたMB24と称されるものを含めて11のアボB特異性ペラトープ分子の生成および確認を報告した。ハイブリドーマHB8742はヒトVLDLで免疫処置したマウスの脾細胞と骨髓腫細胞との融合により得られた。

MB24はVLDLおよびLDL中に存在する変性アボB-100並びにLDLの変性アボリボタンパク質B-26およびその論文中の未確認高分子量LDLタンパク質と免疫反応することが示された。より最近の研究はそれがアボB-48を結合することを示した。MB24はツァオ (Tsao) ほか、(1982)、シャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J.Biol.Chem.)、257:15222~15228中に液相RIAで存在した自然LDL抗原100%と免疫反応することが示された。

HB8742の腹腔内成長から生成したMB24含有腹水のIgG画分は等電点電気泳動 (IEF) により確認した。カーティス (Curtiss) ほか、(1982)、シャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J.Biol.Chem.)、257:15213~15221に記載されたように、融合はIgG<sub>k</sub>免疫グロブリン (骨髓腫タンパク質) を分泌するP3X63Aq8骨髓腫細胞を用いて行なった。従って、IEFでHB8742腹水はP3X63Aq8骨髓腫IgG<sub>k</sub>抗体およびペラトープ分子MB24に加えて無秩序混合型および軽鎖含有免疫グロブリン分子を表わす多重タンパク質バンドの特有のバンドを示した。

ハイブリドーマHB8746はMB47ペラトープ分子を生成し、LDLで免疫処置したマウスの脾細胞とP3X63Aq8.55.3.1骨髓腫細胞との融合により形成された。その単クローニング抗体およびハイブリドーマはヤング (Youna) ほか、(1986)、アルテリオスクレロシス (Arterioscler

24

osis)、6:178~188により報告された。ハイブリドーマの調製に使用されたその種の親骨髓腫細胞系は骨髓腫タンパク質を分泌しない。HB8746腹水のIEFはMB47のIgG<sub>2a</sub>重鎖およびカッパ軽鎖を表わすタンパク質バンドの特有パターンを示す。

従って、上記ハイブリドーマはそれらが分泌するペラトープ分子のIEFパターンにより部分的に確認することができます。ハイブリドーマHB8742が1つ以上の型のペラトープ分子を生成するけれども、本発明に有用なペラトープ分子はアボB-100上のエピトープ (抗原決定基) と免疫反応するそれらの個々の能力により容易に容に確認し、分離することができる。

MB24およびMB47の抗原特異性は個々の検定でキロミクロン、VLDL、LDLおよびHDLから得られたアボタンパク質と免疫反応するそれら個々の能力を検定することにより試験した。得られたデータはMB47およびMB24がLDL、VLDLおよびIDLから得られたアボB-100と免疫反応するが、VLDLまたはキロミクロンからのアボB-48と免疫反応せず、またHDLと免疫反応しないことを示した。MB47およびMB24のFabのフラグメントもまた液相RIAにおいてLDLに結合する。

先の研究はアボB-100中の抗原不均質性を示した。すなわち、若干のアボB-100エピトープはすべてのLDLにより発現されるわけではない。従って、液相RIAにおける過剰の一単クローニング抗体との混合物はすべての放射性標識LDL (<sup>125</sup>I-LDL) ライ子の免疫結合を生ずるわけではない。

MB47分子により認識されたエピトープすべてのLDLにより均一に発現されたかどうかを測定するために、液相RIAにおける<sup>125</sup>I-LDLに免疫結合するMB47の能力を調べた。10名の正常被験者のプールした血漿および1正常被験者から分離したLDLを後記のように放射性標識し、生物学的に活性なMB47分子と混合して免疫反応複合物を形成した。複合物を生物学的検定条件下に、MB47分子が各試料中のアボB-100に免疫的に結合し、免疫反応生成物 (免疫反応物) を形成するのに十分な予定期間保持した。

過剰のMB47ペラトープ分子により結合された最大量の<sup>125</sup>I-LDLを全受容体分子のIgGSRB [ジ・エンザイム社 (The Enzyme Co., Boston, MA) 製] により沈殿させ、沈殿中の<sup>125</sup>I-LDL回収カウントをガンマカウンター中で定量することにより検定した。トリクロロ酢酸 (TCA) により沈殿した<sup>125</sup>I-LDLの百分率として示して第1図に示した結果は実質的にすべての<sup>125</sup>I-LDLが抗体により結合されたことを示し、MB47により認識され、結合したエピトープがすべてのLDLライ子により発現されることを示す。

本発明の検定法に対し、第1および第2単クローニングペラトープ分子はアボB-100分子の異なるエピトープに結合しなければならず、それらのエピトープは1ペラ

特許2656774

(13)

25

トープ分子の結合が他のバラトープ分子の結合を立体的に阻害しないように十分離れていかなければならない。従って、固相若試薬アボB-100に対する相互の結合を競合的に阻害するMB47およびMB24の能力を試験した。

第2図に示したその研究の結果は70倍過剰の非標識MB24がベルオキシダーゼ標識MB47の試薬アボB-100に対する結合を有意に阻害しなかったことを示す。同様に、70倍過剰の非標識MB47がベルオキシダーゼ標識MB24の試薬アボB-100に対する結合を有意に阻害しなかった。従って、MB24とMB47はアボB-100上の異なるエピトープに結合し、それらのエピトープが十分に離れ、MB24およびMB47が無傷抗体として単個アボB-100分子に対する相互の結合を阻害しない。

单クローニ性バラトープ分子AI-10およびAI-11を生成するハイブリドーマはマウス脾細胞とマウス骨髓腫系P3×63A8.653の細胞との2つの別の融合から調製された。ヒトHDLを免疫原として用いた。AI-10分子はIgG2aクラスのものであり、AI-11分子はIgG1クラスのものである。

第3図の試験から知見できるように、AI-10およびAI-11がともにアボA-Iと反応する。第3図のデータはさらに、AI-10またはAI-11のアボA-IまたはHDLとの免疫反応がその抗原との他の免疫反応を妨害しないことを示す。

<sup>125</sup>I-HDLおよび<sup>125</sup>I-アボA-Iを用いる結合研究はカーティス(Curtiss)ほか、(1985)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J.Biol.Chem.)、260:2982~2993に一般的に記載されたようにRIA法を用いて行なった。これらの研究の結果は表1に、全トリクロロ酢酸(TCA)沈降性放射能の百分率として示される。

表 1  
AI-10およびAI-11の免疫反応性

バラトープ分子 <sup>1</sup>	抗原の最大結合(%)	
	<sup>125</sup> I-HDL <sup>2</sup>	<sup>125</sup> I-アボA-I <sup>3</sup>
AI-10:		
上澄み	29.2	90.3
腹水	92.6	-
FPLC腹水	86.0	70.2
AI-11:		
上澄み	88.6	42.0
腹水	100.0	49.0
FPLC腹水	93.0	60.4

1. 液相バラトープ分子はハイブリドーマ細胞培養上澄み(上澄み)、マウス腹水(腹水)、および高速タンパク質液体クロマトグラフ精製腹水(FPLC腹水)から用いた。

2. TCA沈降性放射能の百分率。

表1のデータは用いた液相検定における放射性標識HDL

26

に対する全AI-10およびAI-11の比較的高い結合を示す。これらのデータはまたアボA-I自体の相対的不安定性および生ずるそれに対する低い結合を反映する。アボリボタンパク質A-Iのその相対的な不安定性は、さらに後記するようにアボA-I検定における第2標準としてのHDLの使用を必要とした。上記データはまたHDL粒子に対するよりもアボA-Iに対する比較的低いAI-11の結合を示す。しかしアボA-Iに対してELISA法を用いて得られたデータと他の一層困難な方法により得られたデータとを比較するELISA法が検定した試料中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質A-I(HDL)を定量的に検出することを示す。

### C.異常脂質代謝標識

先に記載したように、若干の研究が比較的低濃度のHDLを有する高濃度のCDLとCADを生ずる異常脂質代謝についてCADの高いおそれとの間の相関を示した。異常脂質代謝はまた臨床的にCADを有すると診断されたヒトにおける疾患原因の追跡に重要である。しかし、それらの研究は正常であるヒトと異常脂質代謝を示すヒトとの間の標識およびそれを明らかに分割する線を提出しなかった。

従って例えばコッケ(Kottke)ほか、(1986)メイヨー・クリニック・プロセーディングス(Mayo Clin.Proc.)、61:313~320はアボリボタンパク質A-I、A-IIおよびB、HDLコレステロール、トリグリセリド並びに年令を男性における変数として測定し、それらの6変数すべての使用が、無症候対照からCAD患者を正確に区別するために必要であることを認めた。それらの研究者はアボリボタンパク質の測定に放射免疫検定を用いた。

多クローニ性抗体、16時間の抗体-試料保持時間、およびアンマスキング界面活性剤処理がコッケ(Kottke)ほかによるアボA-I値のRIA測定に利用されたことが報告された。单クローニ性抗体がアボBのRIA測定に用いられたことが報告された。コッケ(Kottke)ほかは正常およびCAD患者に対する平均血清アボA-I値が1標準偏差内に直ならなかったことを報告した。それらの2群間の平均血清アボB値に対する彼らの値は1標準偏差内で重なった。それらの研究者はアボBおよびアボA-Iに対する値の比を報告しなかった。

さらにベンツエン(Bentzen)ほか、(1982)、クリニカル・ケミストリー(Clin.Chem.)、28:1951~1956はβ-リボタンパク質コレステロール(LDLコレステロール)とα-リボタンパク質コレステロール(HDLコレステロール)との比を患者の発作または冠心病疾患のそれを示す標識として用い、HDLコレステロール単独の値の使用と比較して報告した。もちろん、リボタンパク質コレステロール値はLDLおよびアボB-100またはHDLおよびアボA-Iと異なり、またそれらの研究者により用いられた方法はヘパリン-アガロース上のアフィニティーコロマトグラフィーに基き、ここに用いる方法とは非常に異なる。

(14)

27

## II 改良法

本発明によれば、液体血液試料中のアボリボタンパク質B-100とアボリボタンパク質A-Iとの比を、疾患有すると確認されなかったヒト並びに診断されたCAD患者における異常脂質代謝に対する標識として用いる。CADまたは異常脂質代謝が検定法により確認されれば、そのヒトは典型的には普通の療法、例えば運動、食事または特定薬物により、よく知られているように治療される。

液体血液試料がこの方法に使用される。試料は血清または血漿を用いて得た結果を統計的に区別できないことが認められたので、そのいずれであることもできる。実際に、この方法を用いて後に報告する若干の結果は血清および血漿の両方の検定から得た平均値を用いて得られた。血清または血漿を用いるかに関係なく、液体血液試料は、好みしくは技術的に知られるように少くとも約12時間絶食したヒトから得る。そのような血液試料は「空腹時」試料として示される。

正確かつ精密な結果を、このELISA法を用いて液体血液試料例えは血漿または血清から得ることができたことは、これらの試料が検定を妨害すると予想できたタンパク質、脂質および他の化合物を含むので意外であった。例えはマギオ (Magio)、「酵素-免疫検定 (Enzyme-I immunoassay)」、CRCプレス社 (CRC Press Inc., Boca Raton, FL)、1980、65頁参照。

本発明の改良法において、血液試料を少くとも2つのアリコートに分ける。1試料アリコートはアボB-100の測定に、他はアボA-Iの測定に使用される。

アボリボタンパク質B-100に対する分析から説明すると、予定量の第1液体血液試料アリコートを、アボB-100と免疫反応する固相結合第1単クローニングバラトープ分子を有する固体マトリックスから実質的になる固体支持体と混合することにより第1固-液相混合物を形成する。それらの固相結合第1単クローニングバラトープ分子は試料中に予想されるアボB-100の量より過剰に存在し、ATCC受託番号HB8742またはHB8746を有するハイブリドーマの1つにより分泌される。固体支持体の表面上の非特異的タンパク質結合部位は混合の前にブロックされる。

その第1固-液相混合物を生物学的検定条件下に、第1バラトープ分子が試料アリコート中に存在するアボリボタンパク質B-100と免疫反応し、試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質B-100を含む固相結合免疫反応物を形成するのに十分な予定期間保持する。

第1試料アリコートのアボB-100はまたアボリボタンパク質B-100と免疫反応する液相第2単クローニングバラトープ分子と混合して第2混合物を形成する。それらの第2単クローニングバラトープ分子はATCC受託番号HB8742またはHB8746を有するハイブリドーマの1つにより

特許2656774

28

分泌されるが、しかし初めに挙げた混合物に使用されないものである。その第2バラトープ分子はまた酵素指示手段に使用可能に連結される。

第2混合物は生物学的検定条件下に、第2の酵素結合バラトープ分子が試料アリコート中の実質的にすべてのアボリボタンパク質B-100を含む免疫反応物を形成するのに十分な予定期間保持する。

西バラトープ分子の混合、および西バラトープ分子とアボB-100との間の免疫反応物の形成から生ずる固相および液相は例えは洗浄により分離し、分離した固相中に存在する指示手段結合アボリボタンパク質B-100含有免疫反応物の量を測定する。2つの単クローニングバラトープ分子が試料アリコート中に存在する実質的すべてのアボB-100と免疫反応するので、またバラトープ分子の少くとも1つがアボB-100上の非交差反応性の保存エピトープと免疫反応するので、免疫反応物中の酵素結合アボB-100の量の測定は試料アリコート中に存在するアボB-100の測定を与える。試料単位容積当たりのアボリボタンパク質B-100の量は初めて用いた予定期量の液体血液試料アリコートの容積の知識により容易に計算することができる。

アボリボタンパク質A-Iの量は第2の予定期量の液体血液試料アリコートを用いて測定される。他の人により用いられた操作とは対照的に、第2液体血液試料アリコートはアボA-Iの測定に普通であるようなアンマスキング処理を含まない。

アボリボタンパク質B-100について前に記載したと類似の段階に従うが、しかしATCC受託番号HB9200またはHB9201を有するハイブリドーマの1つにより分泌された第3および第4の単クローニングバラトープ分子が第2液体血液試料アリコートに対して使用される。前記段階に類似して、固相結合第3単クローニングバラトープ分子を第2液体試料と混合して第3固-液相混合物を形成し、その第3固-液相混合物を前記のように保持して試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質A-Iを含む固相結合免疫反応物を形成させる。

第2試料アリコート中のアボリボタンパク質A-Iはまた、固体マトリックスに結合したものでなく酵素指示手段に作用可能に結合した前記液相第4単クローニングバラトープ分子と混合して第4混合物を形成する。その第4混合物は前記のように第4酵素結合単クローニングバラトープ分子が試料アリコート中に存在する実質的にすべてのアボリボタンパク質A-Iと免疫反応物を形成するのに十分な時間保持する。

混合および保持段階から生ずる固相および液相を分離し、分離した固相中に存在する酵素指示手段結合アボリボタンパク質A-I含有免疫反応物の量を測定し、それにより前記のように試料アリコート中および単位容積当たりのアボリボタンパク質A-Iの量を決定する。

前記アボB-100およびアボA-Iに対する検定はそ

(15)

29  
それぞれ、連続的に行なわれる各検定における混合および保持段階のそれそれで行なうことができ、または各検定における2つの混合段階を実質的に同時に行なって各検定における2つの保持段階を一緒に行なうことができる。

段階を連続的に行なうときに酵素指示手段結合パラトープ分子の混合および生ずる混合物の保持の前に固相結合単クローニン性パラトープ分子を混合し、形成された混合物を保持することが好ましい。好ましい連続段階に従うとき、さらに形成された固相と液相を分離し、固相を洗浄して分離を保証に役立たせた後液体酵素指示手段結合パラトープ分子を分離した固相に混合し、その混合物を保持することが好ましい。

酵素指示手段結合パラトープ分子を初めに適當な試料アリコートと混合できることもまた認められる。方法を実施するこの方式を用いるときには固相結合単クローニン性パラトープ分子の混合前の相の分離は存在しない。

アボリボタンパク質B-100およびアボリボタンパク質A-1の両方の検定に対して最も好ましくは、固相結合単クローニン性パラトープ分子、血液試料アリコートおよび酵素指示手段結合パラトープ分子を別個に実質的に同時に混合し、生ずる固-液相混合物をそれぞれ一緒に保持する。従って、各混合物は2つの別の固相結合単クローニン性パラトープ分子がそれぞれ実質的にすべてのアボB-100およびアボA-1と固相結合免疫反応物を形成し、また2相の液体酵素指示手段結合パラトープ分子もまたそれぞれの試料アリコート中の実質上すべてのアボB-100およびアボA-1とそれぞれ免疫反応するのに十分な時間保持される。形成された免疫反応物は固相結合サンドイッチ免疫反応物として示される。液相もまた存在する。

同様の結果が2組のパラトープ分子の単クローニン性パラトープ分子のいずれかをそれぞれの検定における固相結合パラトープ分子として用いて得られる。しかし、ここに論議した研究の大部分は、アボリボタンパク質B-100を検定したときに固体マトリックスに結合したATCC受託番号HB8746を有するハイブリドーマにより分泌された分子(MB47)を、およびアボリボタンパク質A-1を検定したときに固相マトリックスに結合したATCC受託番号HB9200を有するハイブリドーマにより分泌された分子(AI-10)を用いて行なった。さらに、MB47の分子が、非空腹時血液試料のキロミクロン中または異常に高いキロミクロン濃度を有するヒト中に存在することができるアボB-48と免疫反応しないのでMB47を固相結合パラトープ分子として用いることが非常に好ましい。従って、固体支持体に対するキロミクロンの結合は、それらの大きな大きさのために固相結合パラトープ分子の量が検定試料中のアボB-100より過剰である場合でも、実質的にすべてのアボB-100(LDL)の追加結合を妨害することができる。

特許2656774

30

上記方法に有用な典型的な固体マトリックスはよく知られ、固体マトリックス例えは呼称ファルコン(Falcon) ミクロテスト IIIフレキシブル・アッセイ・プレートのもとで販売される96ウェルミクロタイターブレート〔ファルコン・プラスチックス(Falcon Plastics Oxnard, CA) 製〕、または一列に12ウェルを含むミクロタイターストリップ例えは呼称イムロン(Immulon) IおよびIIのもとで販売されるストリップ〔ダイナテク(Dynatech, Alexandria, VA)〕が含まれる。ミクロタイターストリップまたはプレートは透明プラスチック材料、好ましくはポリ塩化ビニルまたはポリスチレンで作られる。本発明の前記方法に用いる他の固体マトリックスは Abbott・ラボラトリーズ(Abbott Laboratories, North Chicago, IL)から入手できる直径約1ミクロン～約6ミリメートルのポリスチレンビーズ；任意の普通の大きさのポリスチレン管、棒またはパドル；およびポリスチレン粒子が約1ミクロンの大きさであり、ラテックスの残余から追心分離的に分離できるポリスチレンラテックスが含まれる。

20 固体マトリックスはまた種々の材料例えは交差結合デキストラン例えはファルマシア・ファイン・ケミカルズ(Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)から入手できるセファデックス(Sephadex) G-25, -50, -100, -200など、アガロースおよび交差結合アガロース例えは、またファルマシア・ファイン・ケミカルズ(Pharmacia Fine Chemicals)から入手できるセファロース(Sephadase) 6B, CL6B, 4B, CL4Bなどで作ることができます。

酵素指示手段は本発明に有用なパラトープ分子に直接結合させて結合体を形成させる。パラトープ分子に結合した有用な酵素分子が作用可能に結合することを理解すべきである。従って、酵素の機能は結合またはパラトープ分子により実質的に損なわれずまた酵素が結合する単クローニン性パラトープ分子の機能が結合または酵素の存在により実質的に損なわれない。

酵素指示手段は生物学的に活性な酵素例えは西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)またはグルコースオキシダーゼなどである。よく知られているように、指示手段がHRPOまたはグルコースオキシダーゼのような酵素である場合に、抗体-抗原複合体が形成された亭亮を可視化するため他の試薬が必要である。HRPOに対するそのような追加の試薬には過酸化水素および酸化染料前駆物質例えばジアミノベンジシンが含まれる。グルコースオキシダーゼで有用な追加の試薬にはグルコースおよび2,2'-アジノーシ(3-エチルベンジチアジリシン-6-スルホン酸)(ABTS)が含まれる。

酵素をパラトープ分子に作用可能に結合して結合体を形成する方法はよく知られている。典型的な方法はマギオ(Maggio)、「酵素-免疫検定(Enzyme-Immunoassay)」、カバコフ(Kabakoff)による第4章、CRCプレス

56

(16)

特許2656774

31

(CRC Press, Boca Raton, FL) (1980)、71~104頁に論じられている。

单クローン性パラトープ分子はハイブリドーマ上澄みまたは腹水から得られたまま用いることができる。しかし、精製パラトープ分子を用いることが好ましい。

パラトープ分子を精製する若干の方法がよく知られ、典型的にはクロマトグラフィー技術を用いる。高速タンパク質液体クロマトグラフィー (FPLC) はここに述べた精製法である。

酵素結合パラトープ分子結合体は液相で混合物に与えられる。それらの分子は、典型的には水性組成物に溶解される。典型的な組成物には、リン酸塩緩衝食塩水 (PBS) を希釈剤として含むここに用いた典型的な精製单クローン性抗体含有組成物の場合のように緩衝液が含まれる。希釈腹水もまた有用である。

前に記載したように、固相支持体の表面上の非特異的タンパク質結合部位はブロックされる。従って固相結合パラトープ分子は例えば吸着または固体マトリックスに付着させる他のよく知られた手段により結合される。その後検定を妨害しないタンパク質例えばヒトアボB-100またはアボA-Iによる汚染のないウシ、ウマまたは他の血清アルブミンの水溶液を固相と混合して混合したタンパク質をパラトープ分子含有固体支持体の表面上、单クローン性パラトープ分子により占有されない表面上のタンパク質結合部位に吸着させる。

典型的なタンパク質水溶液は7.1~7.5のpH値でPBS中に約3~約10重量%のウシ血清アルブミンを含む。タンパク質水溶液-固体支持体混合物は典型的には37°Cで少くとも1時間保持し、その後生じた固相を洗浄して非結合タンパク質を含まなくする。

液体血液試料は既に記載したように血漿または血清であることができる。アボA-Iのための試料は特定的に後記する検定で線状結果を得るために使用の前に、好ましくは約1:2,500~約1:20,000、より好ましくは約1:5,000に希釈する。アボB-100のための試料は好ましくは約1:500~約1:5,000、より好ましくは約1:1,000に希釈する。低い希釈度の使用は混合物に多量のアボリボタンパク質抗原を与えて検定結果の直線性を損ない、また混合した抗原を越える固相結合パラトープ分子の過剰を低下または破壊することができる。約1:20,000以上の希釈の使用は精度を低下する傾向がある。

用いる保持時間は広範に変えることができ、周囲室温(約20~25°C)で約30分の最小時間を使用すれば変動が小さい。最小30分の保持時間を用いることを望む場合に保持混合物をその時間中かくはんし、アボリボタンパク質抗原と单クローン性パラトープ分子との間の実質的に完全な免疫反応を保証することが好ましい。より長い保持時間例えば室温で1時間以上を用いる場合にはかくはんは必要でない。所望のかくはんは約100rpmで操作するジャイロシーカーにより容易に供給できる。この方法

32

に用いるそれぞれの検定は周囲室温で約30~約60分のパラトープ分子-試料混合物保持時間用いて行なうことができる。

検定した先駆反応物中に存在するアボリボタンパク質抗原の量は分離した酵素結合アボリボタンパク質含有固相と予定量の可視化試薬または試薬類との混合により測定する。HRPOを酵素指示手段として用いる場合には水性媒質中に存在する可視化試薬例えは過酸化水素および酸化性染料前駆物質例えはオーフェニレンジアミン (OPD) を、分離した固相結合先駆反応物と混合する。そのように形成された複合物を生物学的検定条件下に予定時間例えは室温で少くとも約30分間発色のために保持する。その後停止剤例えは硫酸の混合により発色を停止させる。その後組成物の光学濃度を読み、標準曲線値と比較し、よく知られるようにアボリボタンパク質の量を決定する。

従って、固体支持体および液体血液試料が調製されれば各検定は周囲室温で約1時間の時間、すなわち両パラトープ分子および試料アリコートから形成した混合物に対する30分かくはん保持時間および発色に対するさらに30分の保持時間、で行なうことができる。実際に固体支持体を各使用の直前に調製する必要がなく、むしろここに記載したような支持体を調製し、湿润かつふたをして通常の冷凍条件下に使用の前少くとも1ヶ月間貯蔵することができる。

アボB-100およびアボA-I 検定はそれぞれELISAで得られた光学濃度値を比較してそれらの2つのアボタンパク質の濃度を計算する標準を用いる。両検定は二次基準を用いる。すなわち検定はアボB-100およびアボA-Iを標準として用いるよりはむしろそれぞれヒトLDLおよびHDLを標準として使用する。一次アボリボタンパク質が貯蔵において比較的不安定なために二次標準が使用される。コッケ (Kottke) や共同研究者もまた一次標準として用いた精製アボA-Iの劣化を記載し、アボA-Iに対する多クローン性血清による彼らのRIA用二次標準を用いた。オウ (Au) ほか、(1986)、クリニカル・ケミストリー (Clin.Chem.)、32:1394~1397。

二次標準は、典型的にはブールしたヒト空腹時血漿の凍結乾燥したLDLおよびHDLとして提供され、使用前に液状に戻される。それぞれの標準はそれ自体LDLとしてアボB-100およびHDLとしてアボA-Iの一次標準に対して標準される。典型的な操作は物質および方法のセクション中にアボリボタンパク質B-100 (LDL) およびアボリボタンパク質A-I (HDL) に対して示される。

### III. 診断装置

本発明はまた前記方法の実施に使用できる診断装置を、典型的にはキット形態で意図する。装置には個々の容器中に少くとも前記单クローン性パラトープ分子、アボB-100と免疫反応するMB47およびMB24、並びにアボA-Iと免疫反応するAI-10およびAI-11が含まれる。

(17)

33

各対のバラトープ分子の1つ；すなわちMB47およびMB24の1つ、並びにAI-10およびAI-11の1つ、は結合体として酵素指示手段に結合される。容器は異常脂質代謝の標識として少くとも1検定を行なうのに十分なそれぞれの量のそれらのバラトープ分子を含む。

より好ましくは、それぞれがそれぞれアボB-100またはアボA-Iと免疫反応する単クローニ性バラトープ分子を結合した固体マトリックスから実質的になり、表面非特異的タンパク質結合部位をブロックされる2つの固体支持体、並びにそれぞれアボB-100およびアボA-Iと免疫反応する2つの個々に包被された酵素結合単クローニ性バラトープ分子結合体を含む。その4つのバラトープ分子は前記のように使用される。

上記診断系の固相マトリックスは前記固相マトリックスのいずれかであることができるけれども、両マトリックスは好ましくは同型のものである。ミクロタイターウェル例えば前記12ウェルストリップおよび96ウェルプレートが殊に好ましい。固体支持体上の非特異的結合部位は前記のようにブロックされる。

固体マトリックスはこの様様の結合した単クローニ性バラトープ分子のための容器を構成する。酵素結合単クローニ性バラトープ分子に対する典型的な容器はガラスまたはプラスチック例えばポリエチレンまたはポリプロピレンで作ったバイアルまたはびんである。

ミクロタイターウェルを典型的な固体マトリックスとして、また全単クローニ性抗体MB47およびAI-10を固相结合当クローニ性バラトープ分子として、血清を液体血液試料として、並びにHRPOに結合した単クローニ性抗体MB24およびAI-11を用いるとき、キット形態の典型的な一層好ましい診断装置は次の：

- 血液試料アリコートの検定をその中に存在するアボリボタンパク質B-100の量について行なうのに十分な量結合した単クローニ性抗体MB47を有するミクロタイターウェルから実質的になり、表面非特異的結合タンパク質結合部位をブロックされた固体支持体、
- 血液試料アリコートの検定をその中に存在するアボリボタンパク質A-Iの量について行なうのに十分な量結合した単クローニ性抗体AI-10を有するミクロタイターウェルから実質的になり、表面非特異的結合タンパク質結合部位をブロックされた固体支持体、
- 血液試料アリコートの検定をその中に存在するアボB-100の量について行なうのに十分な量存在するHRPO結合した単クローニ性抗体MB24を含む水溶液を入れた別の容器、
- 血液試料アリコートの検定をその中に存在するアボA-Iの量について行なうのに十分な量存在するHRPOに結合した単クローニ性抗体AI-11を含む水溶液を入れた別の容器

を含む。  
最も好ましくは、診断装置は上記4成分(a~d)および

特許2656774

34

より次の：(i)既知濃度の過酸化水素の供給、(ii)可視化酸化性染料前駆物質例えばOPD、(iii)発色反応をケンチするための停止剤の溶液例えば4N硫酸、(iv)検定に用いる乾燥または液体形態の1種またはそれ以上の緩衝剤、(v)標準照合曲線調製用物質(vi)検定を行なうための使用説明書、の1つまたはそれ以上を含む。すぐ前に列挙した成分はそれぞれ少くとも1検定の実施に十分な量で診断装置中に存在し、それらの成分は適切であるように個々に容器される。

#### IV. 結果

前に記載され、後に物質および方法のセクション中に詳細に記載される検定法を用いて得られた結果が次に論議される。ポリエチレン69ウェルミクロタイターウェルのウェルを固体マトリックスとして用いた。全単クローニ性抗体MB47およびAI-10をそれぞれアボリボタンパク質B-100およびA-Iの検定における固相結合第1および第3単クローニ性バラトープ分子として用いた。固体支持体表面上の非特異的タンパク質結合部位はBSAでブロックした。HRPO結合単クローニ性抗体MB24およびAI-11をそれぞれアボリボタンパク質B-100およびA-Iの検定における第2および第4単クローニ性バラトープ分子として、可視化酸化性染料前駆物質としてのOPDとともに用いた。

アボB-100およびアボA-Iに対する検定はCADの病歴のない37人にについて行なった。これらのヒトは「正常」として示される。

値は希釈した血漿および血清を液体血液試料として用いて得た。それらの値は2試料測間に統計的に有意差を示さないことが認められ、使用のために平均した。

「正常」についての結果は合せて表2に23名の男性および14名の女性について別個に、および「総合」値として示される。

表 2  
正常アボリボタンパク質濃度アボリボタンパク質A-I

	男性	女性	総合
n=23	n=14	n=37	
平均=143	平均=152	平均=147	
S.D.=26.5	S.D.=10.7	S.D.=22.0	
S.D.範囲=116~170	S.D.範囲=141~163	S.D.範囲=125~169	
アボリボタンパク質B-100			
	男性	女性	総合
n=23	n=14	n=37	
平均=78.0	平均=77.5	平均=77.8	
S.D.=17.6	S.D.=20.6	S.D.=18.8	
S.D.範囲=50.4~95.6	S.D.範囲=58.9~98.1	S.D.範囲=59.0~96.6	

(18)

特許2656774

アボリボタンパク質B-100とアボリボタンパク質A-Iとの比		
男性 <sup>1</sup>	女性 <sup>2</sup>	総合 <sup>1</sup>
n=23	n=14	n=37
平均=0.56	平均=0.51	平均=0.54
S.D.=0.18	S.D.=0.14	S.D.=0.15
S.D.範囲=0.40~0.72	S.D.範囲=0.37~0.65	S.D.範囲=0.39~0.69

1. 「n」は各試験におけるヒトの数である。「平均」アボA-IおよびB-100に対してミリグラム毎デシリットルで、また比に対しては無単位パラメーターとして表わして得られた平均値である。「S.D.」は平均値からの1標準偏差の値である。「S.D.範囲」は平均の各側上の1標準偏差の幅である。検定は物質および方法のセクションに記載のように行なった。

CADを有すると臨床的に確認された42名の男性の血清および血漿を用いて同様に値を得た。これらの値を合せて表3に示される。

表 3  
男性CADアボリボタンパク質濃度<sup>1</sup>

アボリボタンパク質A-I
n=42
平均=110
S.D.=28.8
S.D.範囲=81.2~139
アボリボタンパク質B-100
n=42
平均=112
S.D.=27.8
S.D.範囲=84.2~140
アボリボタンパク質B-100とアボリボタンパク質A-Iとの比
n=42
平均=1.08
S.D.=0.38
S.D.範囲=0.70~1.46

#### I. 表2脚註参照

上記データを考察し、それらのデータをコッケ (Kottke) ほか、(1986)、メイヨ・クリニック・ブロシーディングス (Mayo Clin. Proc.)、61:313~320に与えられたデータと比較すると若干の特徴が認められる。

1 特徴は上記検定におけるアボA-Iについての正常およびCAD患者に対する平均値がコッケ (Kottke) ほかにより報告されたものに類似することである。両検定型に対して類似の標準偏差が得られた。

この結果の類似性は若干の理由のために意外であった。第1コッケ (Kottke) ほかの研究者は彼らの検定に介し界面活性剤 (ツイーン2G) アンマスキング処理を用

いたが、本血液試料はそのような処がなかった。第2にコッケ (Kottke) ほかのグループは、一般にここに用いたELISAよりも正確かつ精密であると考えられる放射免疫検定を用いた。フォラー (Foller) ほか、(1976)、ピュレティン・オブ・ザ・ワールド・ヘルス・オルガニゼーション (Bull. World Health Organ.)、53:55~65 参照。第3に通常比較的不均質なアボA-Iとの改良された免疫反応が可能であると考えられる多クローニング抗体がコッケ (Kottke) ほかにより用いられたが、ここでは単クローニング抗体が使用された。第4にコッケ (Kottke) ほかのグループは彼らの多クローニング抗体とアボA-Iとの先駆反応に室温で1時間の保持時間を用いたが、ここでは室温で30分の時間が用いられた。

他の特徴は正常およびCAD患者に対するアボB-100の平均値がコッケ (Kottke) ほかのそれぞれの平均値と比べてこの検定で多少低く、この検定で認められた標準偏差がコッケ (Kottke) ほかにより報告された値よりかなり小さいことである。コッケ (Kottke) ほかおよび本発明者はともにその検定に単クローニング抗体を用いたが、20 コッケ (Kottke) ほかは再びこのELISAとは対照的にRIAを用いた。

アボB-100とアボB-Iとの比を得るためにアボB-100に対する市販RID検定法並びにここに記載したアボA-I検定を用いて比較を行なった。正常およびCAD患者における比に対するこれらの結果の要約が表4に示される。20名の正常および40名のCAD患者のそれぞれからの1血液のアリコートをこの研究に用いて内部制御を与えた。

表 4

異なる方法により得られたアボリボタンパク質B-100とアボリボタンパク質A-Iとの比

本発明 <sup>2</sup>	正常 <sup>3</sup>	
	RID I <sup>2,3</sup>	RID II <sup>2,4</sup>
n=20	n=20	n=20
平均=0.53	平均=0.74	平均=0.58
S.D.=0.12	S.D.=0.23	S.D.=0.17
S.D.範囲=0.41~0.65	S.D.範囲=0.51~0.97	S.D.範囲=0.41~0.75
CAD患者 <sup>3</sup>		
本発明 <sup>2</sup>	RID I <sup>2,3</sup>	RID II <sup>2,4</sup>
n=40	n=40	n=40
平均=1.07	平均=1.28	平均=1.01
S.D.=0.39	S.D.=0.40	S.D.=0.43
S.D.範囲=0.68~1.46	S.D.範囲=0.86~1.68	S.D.範囲=0.53~1.44

1. 男性および女性の血液試料から得た値。

2. 表2脚註参照

特許2656774

(19)

38

37

3. カルビオケムーベーリング(Calbiochem-Behring, San Diego CA)により販売されたRIDキットを血漿でパッケージ使用説明書に従って用いた。
4. タゴ(Tago, Burlingame, CA)により販売されたRIDキットを血漿でパッケージ使用説明書に従って用いた。
5. 臨床CAD発現男性から得た値。

上表中のデータを調べると、正常なヒトおよびCAD患者に対する検査値を、このアボA-1 検定とともにアボB-100について2市販RIDキットのいずれかを用いて得たときに、このアボB-100検定の使用に比べて容認できない大きな重なりが比、標準偏差範囲に得られたことが示される。

#### IV. 物質および方法

##### A. パラトープ分子の調製および精製

###### (1) 抗アボA-1 免疫グロブリンの分離

鉛油0.3mlで感作し、3~50×10<sup>3</sup>ハイブリドーマ細胞を腹腔内注射した10週令Balb/cマウスから腹水を得た。腹水の発生の平均時間は9日であった。遠心分離により23°Cで1時間、15,000×gで清澄化した後腹水をプールし、-20°Cで凍結貯蔵した。

分離したAI-10およびAI-11抗体は10mMトリス、pH8.0中の0~0.5M-NaCl勾配を使用し、ファルマシア(Pharmacia)モノQ-HR5/5陰イオン交換カラム(ファルマシア・ファイン・ケミカルズ(Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)製)を用いて高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)により調製した。精製Fabをアミコン(Amicon)かくはん膜界面透過セル(Danvers, MA; PM30膜)を用いて1ミリグラム毎ミリリットル(mg/ml)の濃度に濃縮し、PBS(リン酸緩衝食塩水、pH7.1)中へ透析し、-70°Cで貯蔵した。

###### (2) 抗アボB-100免疫グロブリンの分離

有用な抗アボB-100パラトープ分子を含む腹水を鉛油0.3mlで感作し、3~50×10<sup>3</sup>ハイブリドーマ細胞を腹腔内注射した10週令Balb/cマウスから得た。腹水の発生の平均時間は12日であった。遠心分離により4°Cで1時間、15,000×gで清澄化した後、腹水をプールし、-20°Cで凍結貯蔵した。

分離した抗体NB47は単クローニングハイブリドーマ腹水のプロテインA-セファロース4Bカラム(ファルマシア・ファイン・ケミカルズ(Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ)製)上のクロマトグラフィーにより調製した。抗体はカラムから0.1モル(M)酢酸で溶離した。

分離したパラトープ分子はまた10mMトリス、pH8.0中の0~0.5M-NaCl勾配をカラム供給方向に従って用いてファルマシアFPLC中のファルマシア・モノQ-HR5/5陰イオン交換カラム上の単クローニングハイブリドーマ腹水の高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)に

より調製した。

##### B. ハイブリドーマ抗体の確認

各ブールの腹水の全ガンマグロブリン(Ig)含量は8.60のpH値における75mMペトナール緩衝液中の酢酸セルロースストリップの1~3ml試料の200ミリポルト(mV)における45分間の電気泳動により得た。Igであった全タンパク質のパーセントはポンソーソーS-染色ゲルのデンシティメータースキャンにより定量し、全タンパク質は前記変形ローリー(Lowry)法により測定した。

NB47およびNB24に対するマウスIg重鎖および軽鎖は0.9%アガロース二元並置により確認した。適切な希釈度の腹水10ミクロリットルを等容積の適切に希釈したウサギ抗マウス重鎖および軽鎖特異性抗体(リットン・バイオネックス社(Litton Bionetics, Inc., Charleston, SC)製)と反応させた。20°Cで約1時間の並置および洗浄後、沈降線を0.5%クーマシーブリリアントブルーR25Gによる染色により確認した。

サブクラスの単クローニング抗体AI-10およびAI-11はメロイ・ラボラトリーズ社(Meloy Laboratories, Inc., Springfield, VA)またはタゴ社( Tago, Inc., Burlingame, CA)から入手できる市販放射免疫並置キットを用いて確認した。腹水を抗IgG1、抗IgG2a、抗IgG2bまたはIgMを含むアガロースゲル中に切ったウェルに供給した。可視沈降環が確認クラスの抗体で制御条件下予定特定時間後に形成された。環の直径は腹水中に存在する特定免疫グロブリンの濃度に比例する。AI-1GはクラスIgG2aと認められ、AI-11はクラスIgG1と認められた。

単クローニング抗体の等電点プロファイルは5~8のpH値範囲内の10%ソルビトールおよび2%アンホリンを含む0.8%アガロース[EF802-300, LKBプロダクターAB(LKB-Produkter AB, Bromma, Sweden)製]中の腹水0.01ml試料の、3ワット定出力における150分間の等電点電気泳動により得た。固定し、乾燥した後ゲルをクーマシーブリリアントブルーで染色して写真に撮った。

##### C. サンドイッチ検定

###### (1) アボA-1(HDL) サンドイッチELISA

a. アボA-1一次標準:HDLおよび分離したアボリボタンパク質A-1の定量

HDL画分(1.063~1.21g/ml)をプールしたヒト血漿から標準超遠心分離法により得てPBS中へ透析した。次いで0.45ミクロンアクロディスク透達試験を通して無菌通過し、4°Cで貯蔵した。HDL画分のタンパク質含量を変形ローリー(Lowry)タンパク質検定法によりBSAを標準として測定した。HDL画分の3番目を二重に行ない、標準曲線の直線部分内の読みを確認した。例えばHDL画分を1:5, 1:10および1:20の希釈で試験した。タンパク質濃度は通常5~10mg/mlであった。長時間貯蔵のためにHDL画分をPBSで1~2mg/mlのタンパク質濃度に希釈した。希釈後、タンパク質濃度を再びローリー(Lowry)検定法により1:2, 1:5, 1:10の希釈で確認した。次いで

(20)

特許 2656774

39

希釈したHDL画分をアリコートなし、4°Cで貯蔵した。

分離したアボリボタンパク質A-Iは多くの市販源から得ることができる。製造者が典型的にはタンパク質含量および純度の記述を含ませているけれども、タンパク質濃度を高にローリー(Lowry)検定法により確認し、必要であればこれらの結果に基いて調査した。アボA-I調製物の希釈は前のセクションに記載したようになつた。調製物をアリコートなし、製造者により示唆されたように貯蔵した。

HDLおよび(または)アボA-I調製物を次に未知試料(1:5,000希釈)としてアボA-I ELISA(後記)で検定した。標準、品質対照、並びにHDLおよび(または)アボA-I調製物の希釈物の完全セットを含む最低2つの検定プレートを毎日5日間にわたりて行なつた。HDLおよび(または)アボA-Iに対してELISA値はローリー(Lowry)タンパク質検定値の20%内で一致した。値が検定した限界内で一致しなければローリー(Lowry)検定を復査して精確タンパク質濃度を確認した。値がなお矛盾すれば、通常調製物の経時変化または汚染を示し、それは一次標準としての使用に適しないと考えた。

一次標準の純度はまた分析用ドデシル硫酸ナトリウム-ボリアクリラミドゲル電気泳動:SDS-PAGEにより測定した。

#### b. アボA-I ELISA二次標準調製物および値の帰属 ：凍結乾燥標準ブル化血漿

新鮮な血漿または血清は一夜絶食した少くとも10名の正常脂肪血被験者から採取した。漏血は非外傷性静脈穿刺により二ナトリウムEDTAを含む無菌管を用いて行なつた。試料は4°Cで30分間、1,500×gで遠心分離し、血漿を清浄密閉管に移し、4°Cでわずかに2時間貯蔵した。等量の試料を合わせ、0.5ml量を酸洗浄ホイートン(Wheaton)5ml血清バイアル中へアリコートなし、一夜(約16~18時間)凍結乾燥した。バイアルを密閉し、4°Cで貯蔵した。

ii 凍結乾燥したブル化血漿標準の戻し液に戻す前にバイアルを室温にさせた。アルミニウム環および栓を除き、バイアル中の真空を徐々に解放する。精密ピペットを用い、再蒸留水0.5mlで、水をバイアルの全面にゆっくり分配することにより乾燥したブル標準を戻した。再び栓をしてバイアルを3~4回適やかに渦流させ、室温で少くとも30分間保持した。標準は強い巻込みまたはかくはんをしないで適やかに渦流させて完全な可溶化を保証した。

#### iii アボA-I二次標準の値帰属

凍結乾燥した二次標準のアボA-I値は、アボA-I ELISAにおいて一次標準(HDLまたはアボA-I)をキャリブレーターとして用いて測定した。ELISA検定操作がここに記載される。

凍結乾燥二次標準を未知試料として三重に、毎日最小

(20)

40

2つの検定プレート上で最低20の値(三重の平均)の生成に少くとも10日間検定した。二次標準を得られたすべての値を平均し、アボA-I値をミリグラム毎デシリットル(mg/dl)で帰属させた。

値の帰属を行なった後、二次標準を用いて標準曲線を構成し、それを対照の完全なセットで、一次標準曲線とともに同じELISAプレート上で検定した。一次および二次標準曲線は毎日最低2つの検定96ウェルプレートで5日間にわたりて検定した。

10 二次標準の値帰属が確認された後標準曲線を構成し、凍結乾燥標準の現在受け入れられたロットで、同一ELISAプレート上で5日間にわたりて検定した(毎日2検定プレート)。

#### c. 検定、一般

分離したAI-10分子を、ポリスチレンマイクロタイヤープレートウェル〔ナンク-イムノ・プレート(Nunc-Immuno Plate)1;アーピング・サイエンティフィック( Irving Scientific,Santa Ana CA) 製〕のウェルに5ミクログラム毎ミリリットル( $\mu\text{g/ml}$ )のAI-10を含むpH9.

20 0の炭酸水素ナトリウム緩衝液0.15mlを各ウェル中に混合することにより付着させた。プレートを4°Cで18時間保持し、次いで0.1%BSAおよび0.05%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウラート(ツイーン20)を含むPBSで3回洗浄した。次いで10%BSAを含むPBS0.2mlを各ウェル中に混合し、混合物を37°Cで1時間保持し、次いで洗浄することにより残留非特異的結合部位をブロックした。そのように調製したウェルは、調製後増温室内に貯蔵すると約1ヶ月までの間使用できる。

ヒトHDLをPBS中に標準対照液として使用する1.0~0.031 $\mu\text{g/ml}$ の範囲の濃度で希釈した。前記のように、

アボA-Iが貯蔵すると比較的不安定であると認められたがHDLは比較的貯蔵安定であると思われる所以、ヒトアボA-IよりはむしろヒトHDLをこれらの検定における標準として用いられる。血漿(または血清)試料はPBS中に1:5,000に希釈した。

標準または試料50ミクロリットル( $\mu\text{l}$ )を三重にウェル中に混合した。この後約5分以内にHRP標識AI-11バラトープ分子を含むPBS50 $\mu\text{l}$ を各ウェル中に混合した。免疫反応混合物を25°Cで30分間保持した。次いで非結合物質を上記のように洗浄することによりウェルから分離した。

HRP標識を含む固相抗体サンドイッチ免疫反応物の量を、新たに調製した基質溶液(3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>および0.57mg/mlを含む蒸留水)0.1mlを混合することにより検定した。

#### d. 段階的アボA-I HDLサンドイッチELISA

アボタンパク質A-IサンドイッチELISAの達成に次の段階を行なつた。市販対照をパッケージ投入により脱イオン水で戻した。対照を適やかに渦流し、室温で20~30分間保持して完全溶液を保証した。

#### (i) 試料および対照

特許 2656774

(21)

41

試料および対照をPBS中に1:5,000に希釈する。系列希釈は次のように行なうことができる：  
 $20\mu\text{L}$  試料 + 1.98mL PBS (1:100) ;  
 上記希釈40μL + 1.96mL PBS (1:5,000)。

## (ii) 標準希釈物

分離したアポA-1 (HDL) 標準をPBS中に4 μg/mLに希釈する。次に0.031 μg/mLまで2倍系列希釈を行なう。例えば868 μg/mLを含む860527と称されるHDLの調製物を用いると、

$$4 \mu\text{g/mL} = 46 \mu\text{L} + 9.954 \text{mL PBS (1:217)} ;$$

$$2 \mu\text{g/mL} = \text{上記21mL} + 1 \text{mL PBS} ;$$

および

$$0.031 \mu\text{g/mL} \text{まで2倍希釈を続ける。}$$

## (iii) HRP標識AI-11希釈物

PBS中のAI-11HRP結合抗体の1:5,000希釈物を用いる。次の希釈を行なうことができる：

$$20\mu\text{L} + 1.98mL PBS (1:100) ;$$

および

$$\text{上記の} 240\mu\text{L} + 11.76mL PBS = (1:5,000)。$$

箔で覆って光から保護する。この量は2プレートに十分である。

## (iv) 3%過酸化水素

30%過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を蒸留水中に1:10に希釈する。

## (v) o-フェニレンジアミン基質

o-フェニレンジアミン(OPD) 1錠【シグマ・ケミカルズ社 (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) 製】を蒸留水15mLに溶解する。3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 62.5 μLを加える。箔で覆って光から保護する。使用直前に毎回基質を新たに作る。

## e. 検定操作

1. 抗体結合ELISAプレートを周囲室温(20~22°C)で少くとも20分間平衡させる。プレートを袋から取出し、プレートを逆にしてウェル中の残り緩衝液を除く。ウェルに洗浄緩衝液(0.1%BSAおよび0.05%ツイーン20を含むPBS、pH7.2) 300 μLを満たして10分間保持する。プレートを逆にして緩衝液を除き、プロットプレートを紙タオル上で乾燥する。ウェルは検定中に10分間以上からにしない。

11. 標準液または試料50 μLを三重に、ウェルに加える。

0 μg/mL標準液はPBS50 μLである。

希釈したHDL標準液50 μLを標準ウェルに加える(0.031, 0.052, 0.125, 0.25, 0.50, 1.0 μg/mL)。

希釈した対照および患者試料50 μLをそれぞれのウェルに加える。

111. HRP結合抗体50 μL / ウェルを全ウェルに加える。

111. プレートをアルミニウム箱で包み、シャイロシェーク (約100RPM) 上に周囲室温(約20~25°C)で30分間

(21)

42.

置く。

v. ウェルに洗浄緩衝液300 μL / ウェルを満たし、次いでプレートを逆にして緩衝液を除くことによりプレートを洗浄する。合計3洗浄のためさらに2回繰返す。プロットプレートを第3洗浄後紙タオル上で乾燥する。プレートは完全に乾燥させない。

vi. 新たに調製したOPD基質100 μL / ウェルを加える。室温で30分間発色させる。

vii. 全ウェルに対し4M硫酸50 μLで反応を停止させる。492nmでO.D.を読む。

2. アポB-100サンドイッチELISA  
a. 二次標準液のための血漿プール採取および凍結乾燥調製

一夜絶食した10名の正常被験者から新血漿を採取する。(被験者はブラックコーヒーまたは茶を飲むことを許される)。

非蛋白性脂質穿刺法により二ナトリウムEDTAを含む気管バキューテーナー管を用いて渦血を行なう。試料を4°Cで3分間1,500xgで遠心分離する。血漿を洗浄な堅くふたをした管に移し、わずかに24時間貯蔵する。

血漿試料等容積を合わせる。アルコート0.5mL置をグロム酸洗浄ホイートン (Wheaton) 5mLアンバー血清びん [WWRサイエンティフィック (WWR Scientific, Division Univar, San Francisco, CA); WWR# 223778] 中へアリコートにする。びん上にゴム栓を、栓上単に1/4"がびんに挿入されるように置く。次いでびんを凍結乾燥の調達置 (Shelf Unit) から取出したトレイ上に置く。

## b. 標準液のための血漿プールの凍結乾燥

凍結乾燥に用いた系はFTSシステムズ・デュラーストップ・糊装置 (FTS Systems Dura-Stop Shelf Unit) 並びにデュラードライ・コンデンサー装置 (Dura-Dry Condenser Unit) [FTSシステムズ社 (FTS Systems, Inc., Stone Ridge, NY) 製] であった。

i. デュラーストップ糊装置を-50°Cに冷却する。

ii. 予め冷却した糊装置中に試料とともにトレイを置くことにより血漿試料を凍結する。熱電対リード検出器を若干のバイアル試料の内側に配置して温度変化をモニタ一する。

iii. 热電対リード検出器が、試料が-50°Cに凍結したこと示すと(約30分、時間は試料の数により異なる)、デュラードライ・コンデンサー装置中の冷媒を作動させる。

iv. 最大低温度を達すると真空ポンプを作動させる。

v. 真空圧が200ミクロンまたはそれ以下に達すると糊装置中の温度を-20°Cに上げる。

vi. 試料をこの温度で約20分間置き、その時点で温度は-10°Cに上げる。

vii. 30分で温度を-50°Cに上げる。4°Cまでの最後の温度上昇は30分後に行なう。

50 viii. 次いで糊装置中の栓を上げゴム栓をびん中へ押込

特許2656774

(22)

43

む。次いで真空を空中で破壊し、試料を取出す。

ix ホイートン・ハンドクリンパー【ホイートン (Hewitt) #224303; VWRサイエンティフィック (VWR Scientific, Division of Univar, San Francisco, CA) 製】を用い、ホイートン・アルミニウムシール (VWRサイエンティフィック (VWR Scientific)、VWR # 226-355) を試料バイアル上に締める。次いで試料を使用まで4°Cで貯蔵する。

#### c. 戻しおよび安定性

##### ! 戻し

凍結乾燥血漿標準液は戻す前に室温でなければならぬ。室温で最低30分が示唆される。

アルミニウム環および栓の除去は注意深くバイアル中の真空をゆっくり解放する。精密ピベットを用い脱イオンH<sub>2</sub>O (0.5ml)で液状に戻す。水をバイアルの壁面にゆっくり分配する。再び栓をし、速やかにバイアルを3~4回渦流させ、室温で少くとも30分間放置する。この標準はまた強く巻込みまたはかくはんさせないで渦流させて溶液を得る。

30分後、使用前にバイアルを穏やかに渦流させる。

#### ii 安定性

標準液は戻す前および後、2~8時間貯蔵する。戻した標準液はそのように貯蔵すると4時間安定である。

#### d. 値の帰属

##### (i) 純合的ELISA

凍結乾燥標準液に対する値の帰属は純合的照合ELISAにおいて一次LDLを用いて決定する。軟質ポリ塩化ビニルミクロタイプレート【ファルコン (Falcon)、マイクロテスト (Microtest) III】を4°Cで15時間LDL5μg/mlを含むPBS200μlでコートした。次いでウェルを1% BSAおよび0.5%ツイーンを含むPBS200μlで3回洗浄した。残留結合部位をPBS中の3%BSA200μlで25°Cで1時間ブロッケした。次いでウェルを再び同一洗浄緩衝液を用いて3回洗浄した。各プレートに含まれた標準曲線に対してLDL-アボB-100標準を0.5%リボタンパク質除去血漿 (LPDP) を含むPBS中に希釈し、32~0.25μg/mlの範囲のLDL濃度を与えた。各検定において、3つの異なる対照：(1) イソラブ (Isolab) リボ型対照 (Akron, Ohio)、(2) タゴ社 (Taag, Inc.) アボリボタンパク質B照合血清対照 (Burlingame, CA)、および(3) オメガ (Omega) 脂質画分対照血清 (ケーパー・バイオメディカル (Cooper Biomedical, Malvern, PA))、を用いた。各対照は製造者の使用説明書に従つて調製した。

血清試料および対照はLPDP/PBS希釈緩衝液中に200倍に希釈した。標準、対照、および未知の50μlをピベットでウェルに入れ、直ちに一定濃度のMB24腹水 (3%BSA/PBS中に2,000倍希釈) 50μlを入れた。次いでプレートを4°Cで15時間インキュベートした。測定はすべて三重に行なった。再びウェルを洗浄した後、1%BSA/PBS

44

中に4,500倍希釈したHRPC結合ヤギ抗マウス IgG100μlをウェルに加え、25°Cで正確に1時間インキュベートし、次に再び洗浄した。3%BSAおよび0.67mg/ml O-フェニレンジエチレン (OPD) [Cat# 2781, シグマ (Sigma)] を含む基質溶液を蒸留水中に希釈した。3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>および0.67mg/mlのO-フェニレンジアミン (OPD) を蒸留水中に含む新たに調製した基質溶液を全ウェルに加え、25°Cで30分間発色させた。4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50μlの添加により反応を停止させ、次いで溶液の光学密度 (O.D.)

10 を96ウェルミクロタイプレーター【ダイナテク (Dynatech) MR600; Alexandria, VA】を用いて490nmで測定した。

##### (ii) アボB-100サンドイッチ検定

次の段階は凍結乾燥標準を直接サンドイッチ検定に用いることである。ポリスチレンミクロタイプレート【ナンクームノ (Nunc-Immuno) プレート】を、1μg/mlを精製MB47を含む炭酸水素ナトリウム緩衝液、pH 9.0、150μlで、4°Cで16時間コートした。プレートを0.1%BSA、0.05%ツイーンを含むPBSで3回洗浄し、次いで正確に競合的検定に記載するように3%BSAでブロックした。LDL-アボB連続乾燥標準を1:200のLPDP/PBS (希釈緩衝液) 中に0.125~4.0μg/mlの範囲の濃度に希釈した。競合的ELISAについて記載したと同じ対照をこの検定に用いた。血清試料および対照を希釈緩衝液中に1,000倍希釈した。標準、対照、および未知の50μlをウェルに三重に加えた。次いで一定濃度のHRPC結合MB24を含むPBS50μlを直ちにピベットで全ウェルに入れた。プレートを25°Cで正確に30分間インキュベートし、洗浄し、OPD基質溶液100μlを加えて25°Cで30分間インキュベートした。4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50μlの添加により発色を停止し、プレートを純合的ELISAにおけるようにミクロタイラリーダーで読む。

##### D. 競合的ELISA

LDLの形態における試薬アボB-100を固体マトリックスとしての軟質ポリ塩化ビニルミクロタイプレートウェル【マイクロテスト (Microtest) III、ファルコン・ラブウェア・ベクトン・ディッキンソン社 (Falcon Labware, Becton Dickinson & Co., Oxnard, CA) 製】の壁に、分離したヒトLDL5μg/mlを含むPBS0.2mlを各ウェル中に混合することにより付着させた。ウェルは4°Cで15時間保持し、次いで1%BSA、0.5%ツイーンおよび0.02%アプロチニン (シグマ・ケミカル社 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 製) を含むPBS0.2mlで3回洗浄した。残留非特異的結合部位は非競合的ELISAに記載したようにブロッケした。

非特異的結合部位はPBS中の3%BSAで室温で30分間コートすることによりブロッケした。次いでプレートを0.1%BSA、0.01%アシ化ナトリウムおよび0.05%ツイーン20をさらに含むPBS洗浄緩衝液で洗浄した。

各プレートに関して含まれた標準曲線のために、試薬

50

特許2656774

(23)

45

LDLを0.5%リボタンパク質除去血漿（LPDP）を含むPBSに希釈して32~0.25μg/mlの範囲の濃度を与えた。

血漿試料を0.5%LPDPを含むPBS中に1:200で希釈し、標準液または試料の50ミクロリットルを三重にウェル中に混合した。その後約5分以内に3%BSAおよびMB24パラトープ分子約4μg/mlを含むPBS50μlを各ウェル中へ混合した。形成された混合物を4°Cで約1時間保持した。次いで非結合物質を固相付着MB24-試薬アボB-100免疫反応生成物から前記のように洗浄することにより分離した。

検定のために1%BSAおよび有効量のHRP標識標準ヤギ抗体マウスIgGを含むPBS0.1mlを各ウェル中に混合することにより固相免疫反応物を調製した。この第2免疫反応混合物を24°Cで約1時間保持し、次いで上記のように洗浄してサンドイッチ免疫反応物を形成した。

HRP標識を含む固相付着アボB-100免疫反応物の量を競合的ELISAに記載したように検定した。

#### E. 血漿試料およびリボタンパク質

##### 定量化

血漿試料はサン・シェゴVA病院（San Diego VA Hospital）で心臓カテーテル法研究所から冠動脈疾患を有する20名の患者から得た。さらに血漿を37名の正常被験者から得た。

血液を、1.5mg/mlのエチレンジアミン四酢酸塩（EDTA）を含む管に採取し、血漿を直ちに4°Cで遠心分離により分離した。

全血漿コレステロールおよびトリグリセリドは規格化臨床研究所において新血漿試料で、アボット（Abbott）ABA-200二色アナライザー並びにペーリングー・マンハイム（Boehringer-Mannheim）高速コレステロール試薬236691およびアボット・ラボラトリーズ（Abbott Laboratories）トリグリセリド試薬を用いて測定した。LDL-およびHDL-コレステロールは「脂質研究臨床手順（Lipid Research Clinic procedures）」保健教育福祉省発行No.75-628（NIH）、2版Washington D.C.政府印刷所（1974）に記載された方法を用いて測定した。アボタンパク質B濃度は2市販放射免疫拡散キット：ディフューゲン（Diffu-gen）RID（タゴ社（Tago, Inc., Burlingame, CA）製）、ここにRID Iと称す、およびM-パーティゲン（Partigen）RID（カルビオケム-ペーリング（Cal biochem- Behring, La Jolla, CA）製）、ここにRID IIと称す、を用いて測定した。

#### F. 液相<sup>125</sup>I標識抗原RIA

MB47およびMB24により結合された<sup>125</sup>I-LDL粒子の区分を測定するために液相RIAをツアオ（Tsao）ほか、（1982）、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミスト\*

46

\* リー（J.Biol.Chem.）、257:15222~15229の一般操作に従って用いた。2つの異なるLDL（d = 1.019~1.063g/ml）1) 調製物：10名の正常被験者のプールした血漿から分離したものおよび1正常被験者の血漿から分離したもの、を調べた。

ヨードゲン（ピアス・ケミカル社（Pierce Chemical Co., Rockford, IL）法を用いて調製した<sup>125</sup>I-LDL（2,000cpm/ng）は90%トリクロロ酢酸（TCA）沈殿性であった。その組成物を9%ウシ血清アルブミン（BSA）【シグマ（Sigma, St.Louis, MO）製】中に希釈し、各検定の前に15分間30,000×gで遠心分離して複合体物質を除いた。

検定は三重に、12×75mmガラス管中で150mM-NaCl、0.02%アジ化ナトリウム、3%BSAおよび1.5mMナトリウム-EDTAを含む8のpH値における55mMナトリウムバルビタール緩衝液中で行なった。<sup>125</sup>I-LDL[20ナノグラム（ng）LDLタンパク質を含む]0.1mlに、緩衝液または純度の抗原0.1mlおよびBSA-バルビタール緩衝液中に希釈した増加濃度の分離MB47受容体0.1mlを加えた。4°Cで18時間後、Ig Sorb（ジ・エンザイム社（The Enzyme Co., Boston, MA）製）0.1mlに混合した。保持2時間後、BSAを含まないバルビタール緩衝液2mlに加え、管を直ちに1,500×gで60分間遠心分離した。生じた沈殿をバルビタール緩衝液で2回洗浄した。

AI-10およびAI-11を用いる検定は前記ツアオ（Tsao）ほかおよびカーディスほか（Curtiss and Edgington）、（1985）、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J.Biol.Chem.）、260、2982~2993に論議されたと同様に行なった。従って、放射性ヨウ素化抗原（HDLまたはアボリボタンパク質A-I）0.1mlにリン酸乾燥食塩水、pH7.2、0.1mlおよび1:50の正常マウス血清中に希釈した種々の希釈度のマウスハイブリドーマ培養液または液体0.1mlを加えた。全緩衝液はまた5%チキストラン（mM40,000）を含有した。4°Cで18時間後、沈降性第2抗体（ヤギ抗マウスIgG血清）0.1mlを加えた。4°Cで4時間インキュベートした後、冷PBS2mlを加え、管を4°Cで39分間、2,000×gで遠心分離した。上澄みをデカントし、ペレットの<sup>125</sup>I活性をガンマカウンターにて測定した。

最大沈降性放射能はIgSorb（MB47に対し）または第2抗体（AI-10およびAI-11に対し）を100%TCAに代えて測定した。最小沈降性放射能または非特異性結合（NSB）は特異性ハイブリドーマ抗体を同様の重鎖クラスの無関係なハイブリドーマに代えることにより測定した。

データは次のように計算した：

$$\text{MEAN - NSB} \times 100$$

$$\text{TCA} - \text{NSB}$$

ただし、MEANは所与置の特異性抗体の存在下に沈殿し、50%平均放射能であり、TCAは最大TCA沈降性放射能である。

る。

C.AI-10およびAI-11に対する競合的免疫酵素法検定

軟質ポリ塩化ビニルミクロタイプレートをHDLまたは錯製アボA-15μg/mlを含むリン酸塩緩衝食塩水(PBS)0.2mlで、4°Cで約18時間(一夜)コートした。1.0gBSAおよび0.5mlツイン20毎リットルを含むPBS0.3mlでウェルを3回洗浄した。ウェル上の残留結合部位を、30BSA毎リットルを含むPBS0.2mlをウェル中で室温(20~25°C)で1時間インキュベートすることによりブロックした。次いでウェルを洗浄緩衝液で3回洗浄した。プレートを直ちに用いた。

西洋ワサビペルオキシダーゼと結合したAI-10、0.375μg/mlを含むPBS(0.05ml)を、非結合AI-10または非結合AI-11単クローニング抗体(0~8.0μg/ml)を含むPBS0.05mlとともに前コートしたウェル中でインキュベートした。インキュベーション時間は周囲温度(20~25°C)で3時間であった。次いでウェルを洗浄緩衝液で3回洗浄し、O-フェニレンジアミン基質を含むPBS0.1mlを全ウェルに加え、周囲温度で30分間インキュベートした。4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>0.05mlを各ウェルに加えることにより呈色反応を停止し、各ウェルの光学濃度(O.D.)をダイナテク(Dynatech)96ウェルプレートリーダーを用いて490ナノメートル(nm)で測定した。

\* アボA-1コートしたプレートの結果は第3図Aに示され、HDLコートしたプレートを結果は第3図Bに示される。21倍培養の非標識AI-11がHDLまたはアボAIに結合する標識AI-10分子を有意に競合しなかった。その研究はペルオキシダーゼ標識AI-11を非標識AI-10およびAI-11とともに同じ濃度で用いて繰返し、実質的に同じ結果を与えた。

本発明は好ましい態様に関して記載された。開示主題の変更および(または)変形をここに示した本発明の範囲から逸脱することなく行なうことができるることは当業者に明らかであろう。

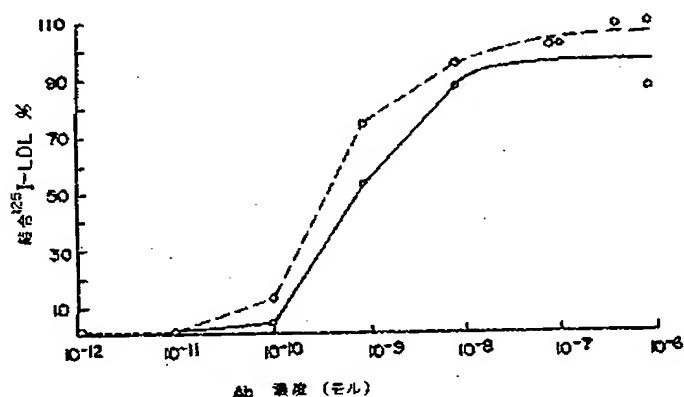
#### 【図面の簡単な説明】

第1図は液相免疫検定(RIA)における単クローニング抗体MB47のモル濃度と結合された<sup>125</sup>I標識LDL粒子との関係を示すグラフであり、

第2図は固相検定においてLDLに結合するペルオキシダーゼ標識MB24およびMB47と競合する非標識MB24およびMB47の能力を示すグラフであり、

第3図はAI-10およびAI-11に対する競合的免疫酵素法検定を示すグラフであり、第3A図はアボA-1コートプレート、第3B図はHDLコートプレートのそれに対するAI-10-HRP(0.375μg/ml)と非標識AI-10および非標識AI-11との競合との競合を示すグラフである。

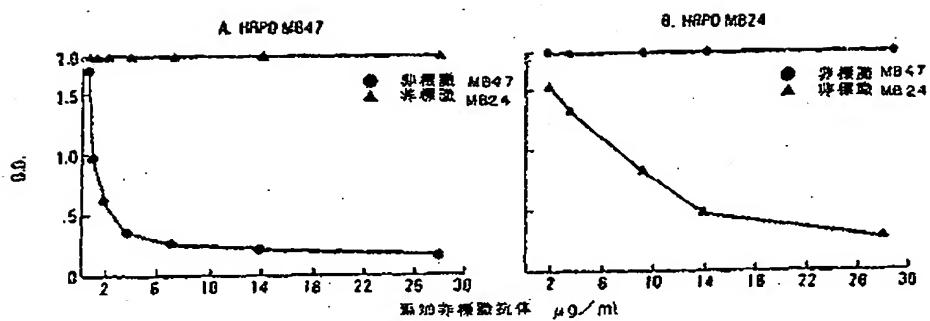
【第1図】



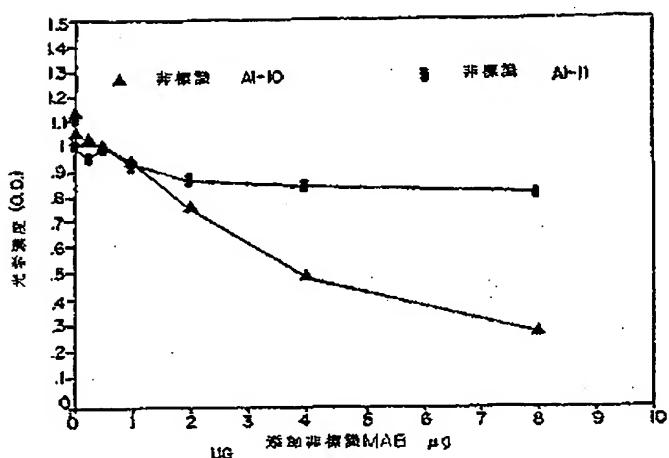
(25)

特許2656774

【第2図】



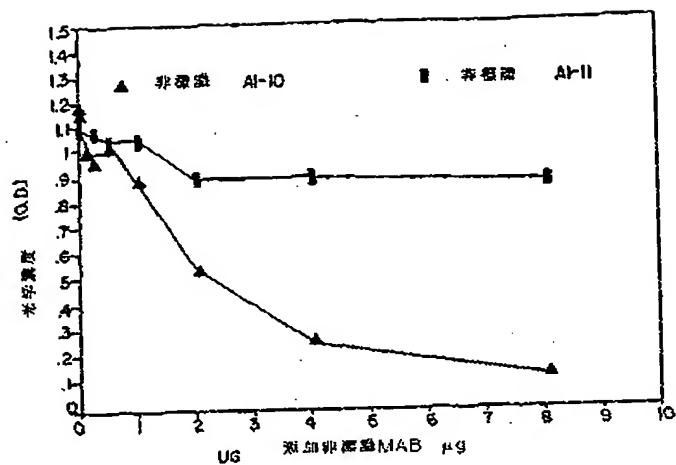
【第3A図】



(26)

特許2656774

[第3B図]



## フロントページの続き

(72)発明者 リンダ ケイ カーティス  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
92126 サンディエゴ フランダース  
ドライヴ 8926

(72)発明者 ショセフ エル ウィッソム  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
92120 サンディエゴ オフリア コ  
ート 6912

(72)発明者 スティーヴン ヤング  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州  
92129 サンディエゴ フリーポート  
コート 10142

(56)参考文献 特開 昭60-253871 (J.P. A)  
特開 昭60-193926 (J.P. A)  
国際公開86/4144 (WO, A1)